

## TRAITE D'COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

<b>Date d'expédition</b> (jour/mois/année) 10 décembre 1999 (10.12.99)	<b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b> SLF1165/1PCT
<b>Demande internationale no</b> PCT/FR99/00915	<b>Date de priorité</b> (jour/mois/année) 20 avril 1998 (20.04.98)
<b>Date du dépôt international</b> (jour/mois/année) 19 avril 1999 (19.04.99)	
<b>Déposant</b> BENVENISTE, Jacques etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

19 novembre 1999 (19.11.99)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

<b>Bureau international de l'OMPI</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	<b>Fonctionnaire autorisé</b> Maria Kirchner
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

## TRAITE . COOPERATION EN MATIE. \_ DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire

VIDON, Patrice  
Cabinet Patrice Vidon  
Immeuble Germanium  
80, avenue des Buttes de Coesmes  
F-35700 Rennes  
FRANCE

Date d'expédition (jour mois année) 05 novembre 1999 (05.11.99)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire SLF1165/1PCT	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR99/00915	Date du dépôt international (jour/mois/année) 19 avril 1999 (19.04.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☐ le déposant    ☐ l'inventeur    ☒ le mandataire    ☐ le représentant commun

Nom et adresse	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☒ la personne    ☐ le nom    ☐ l'adresse    ☐ la nationalité    ☐ le domicile

Nom et adresse VIDON, Patrice Cabinet Patrice Vidon Immeuble Germanium 80, avenue des Buttes de Coesmes F-35700 Rennes FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:  
**Désignation d'un nouveau mandataire.**

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur    ☒ aux offices désignés concernés  
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale    ☐ aux offices élus concernés  
☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international    ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Eugénia Santos
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE  
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

28 AOUT 2000

Destinataire

VIDON, Patrice  
Cabinet Patrice VIDON  
Immeuble Germanium  
80 Avenue des Buttes de Coësmes  
F-35700 Rennes  
FRANCE

COPIE

PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU  
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE  
INTERNATIONAL  
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition  
(jour, mois, année) 25.08.2000

Référence du dossier du déposant ou du mandataire  
5911.WO

## NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No  
PCT/FR99/00915

Date du dépôt international (jour, mois, année)  
19/04/1999

Date de priorité (jour, mois, année)  
20/04/1998

Déposant  
DIGIBIO et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.


### 4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international

 Office européen des brevets  
D-80298 Munich  
Tél. +49 89 2399-0 Tx 523656 epmu d  
Fax +49 89 2399-4465

Fonctionnaire autorisé

Danti, B

Tél. +49 89 2399-8161





T  
16  
TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 30 AUG 2000

WIPO

PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire 5911.WO	<b>POUR SUITE A DONNER</b>	voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)
Demande internationale n° PCT/FR99/00915	Date du dépôt international (jour/mois/année) 19/04/1999	Date de pronté (jour/mois/année) 20/04/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB G01N33/53		
Déposant DIGIBIO et al.		

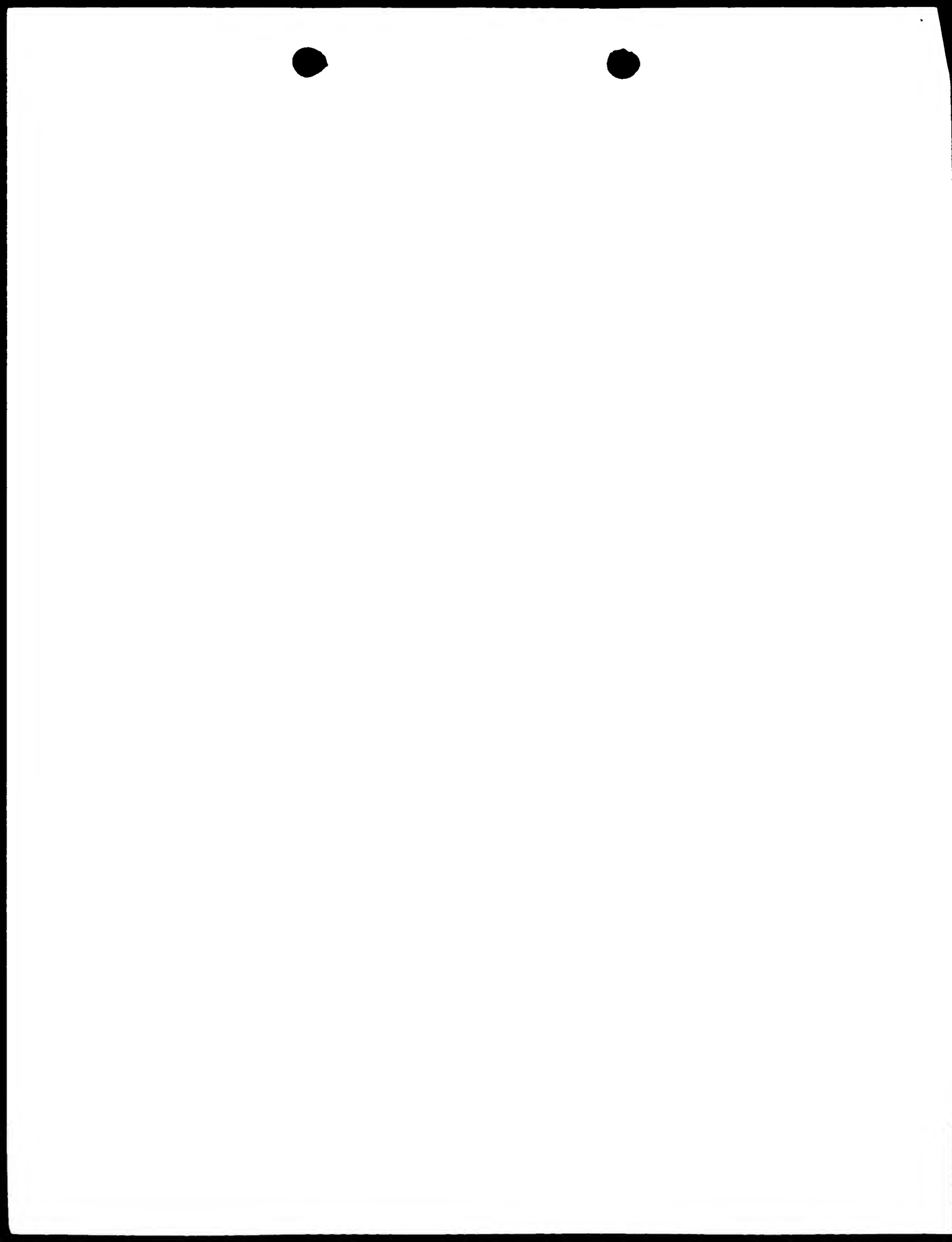
1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.  
☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☐ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 19/11/1999	Date d'achèvement du présent rapport 25.08.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Jacques, P N° de téléphone +49 89 2399 8934 





**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00915

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-28                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-72                      reçue(s) avec télécopie du      10/05/2000

**Dessins, feuilles:**

1/7-7/7                      version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :  
☐ des revendications,    n°s :  
☐ des dessins,              feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.  
☒ les revendications n°s 1-72.



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00915

parce que :

- ☐ la demande internationale, ou les revendications n°s en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☒ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**



**Concernant le point III**

**Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

Une opinion concernant la demande internationale n'a pas été établie car elle ne remplit pas les conditions des articles 5 et 6 PCT.

L'IPEA n'est en effet pas en mesure de déterminer ce que signifie un "signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un élément" car un tel signal n'est pas identifié d'une manière suffisamment claire et complète dans la description.

En effet, ledit signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un élément, est une caractéristique essentielle de l'invention. Cependant "l'identité" de ce signal n'est pas révélée dans la description qui ne présente aucune valeur ou unité de mesure permettant de caractériser ledit signal.

L'objet des revendications 1-72 n'est donc pas supporté par la description (Article 6 PCT) qui ne révèle pas l'invention de manière suffisamment claire et complète permettant à l'homme du métier de réaliser ladite invention (Article 5 PCT).

Les revendications n'étant pas supportées de façon adéquate par la description, il n'est pas possible de formuler une opinion valable.

**Concernant le point VIII**

**Observations relatives à la demande internationale**

Les précisions apportées entre parenthèses dans les revendications 32, 35, 36 et 39 ne permettent pas de définir clairement l'objet desdites revendications qui ne remplissent donc pas les conditions de l'article 6 PCT.



**RAPPORT D'EXAMEN**

Demande internationale n° PCT/FR99/00915

**PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE**

---





# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Reference du dossier du déposant ou du mandataire <b>SLF1165/1PCT</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT ISA 220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 99/ 00915</b>	Date du dépôt international (jour mois année) <b>19/04/1999</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour mois année) <b>20/04/1998</b>
Déposant  <b>DIGIBIO S.A. et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 2 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

**1. Base du rapport**

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remise ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remise ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présente par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présente par écrit, a été fournie.

2. ☐ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

**4. En ce qui concerne le titre,**

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**5. En ce qui concerne l'abrége,**

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38 2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

**6. La figure des dessins à publier avec l'abrége est la Figure n°**

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

CT/FR 99/00915

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 G01N33/53 G01N33/56 G01N33/483 G01N33/487

Seelon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultee (systeme de classification suivi des symboles de classement):

CIB 6 G01N

Documentation consultee autre que la documentation minimale dans la mesure ou des documents relevent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de donnees electronique consultee au cours de la recherche internationale (nom de la base de donnees, et si realisable, termes de recherche utilises)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
X	FR 2 700 628 A (J. BENVENISTE) 22 juillet 1994 (1994-07-22) le document en entier & WO 94 17406 A cite dans la demande ---	1-31
A	FR 2 634 381 A (J.-B. J. C. MOREZ) 26 janvier 1990 (1990-01-26) -----	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiques en annexe

### CATEGORIES SPECIALES DE DOCUMENTS CITES:

A\* document definissant l'etat general de la technique, non considere comme particulierement pertinent

E\* document anterieur, mais publie a la date de depot international ou apres cette date

L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorite ou cite pour determiner la date de publication d'une autre citation ou pour une raison speciale (telle qu'indiquee)

O\* document se referant a une divulgation orale, a un usage, a une exposition ou tous autres moyens

P\* document publie avant la date de depot international, mais posterieurement a la date de priorite revendiquee

T\* document ulterieur publie apres la date de depot international ou la date de priorite et n'appartenant pas a l'etat de la technique pertinent, mais cite pour comprendre le principe ou la theorie constituant la base de l'invention

X\* document particulierement pertinent; l'invention revendiquee ne peut etre consideree comme nouvelle ou comme impliquant une activite inventive par rapport au document considere isolement

Y\* document particulierement pertinent; l'invention revendiquee ne peut etre consideree comme impliquant une activite inventive lorsque le document est associe a un ou plusieurs autres documents de meme nature, cette combinaison etant evidente pour une personne du metier

&\* document qui fait partie de la meme famille de brevets

Date a laquelle la recherche internationale a ete effectivement achevee

30 juillet 1999

Date d'expedition du present rapport de recherche internationale

09/08/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargee de la recherche internationale

Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040 Tx: 31 651 apo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorise

Griffith, G



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00915

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2700628	A	22-07-1994	AU 5887994 A	15-08-1994
			EP 0701695 A	20-03-1996
			WO 9417406 A	04-08-1994
<hr/>				
FR 2634381	A	26-01-1990	NONE	
<hr/>				



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00915

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/483 G01N33/487

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 700 628 A (J. BENVENISTE) 22 July 1994 (1994-07-22) the whole document & WO 94 17406 A cited in the application	1-31
A	FR 2 634 381 A (J.-B. J. C. MOREZ) 26 January 1990 (1990-01-26)	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 July 1999

Date of mailing of the international search report

09/08/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00915

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2700628 A	22-07-1994	AU 5887994 A EP 0701695 A WO 9417406 A	15-08-1994 20-03-1996 04-08-1994
FR 2634381 A	26-01-1990	NONE	



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No

PCT/FR 99/00915

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/483 G01N33/487

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultee (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N

Documentation consultee autre que la documentation minimale dans la mesure ou ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de donnees electronique consultee au cours de la recherche internationale (nom de la base de donnees, et si realisable, termes de recherche utilises)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie *	Identification des documents cites, avec, le cas echéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 700 628 A (J. BENVENISTE) 22 juillet 1994 (1994-07-22) le document en entier & WO 94 17406 A cité dans la demande	1-31
A	FR 2 634 381 A (J.-B. J. C. MOREZ) 26 janvier 1990 (1990-01-26)	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cites:

- \*A\* document définissant l'état general de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour determiner la date de publication d'une autre citation ou pour une raison speciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se referant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cite pour comprendre le principe ou la theorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 juillet 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/08/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Griffith, G

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à... membres de familles de brevets

Internationale No

PCT/FR 99/00915

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2700628 A	22-07-1994	AU 5887994 A EP 0701695 A WO 9417406 A	15-08-1994 20-03-1996 04-08-1994
FR 2634381 A	26-01-1990	AUCUN	

## PROCEDE D'AMPLIFICATION DE LA FORMATION DE COMPLEXES LIGANDS-RECEPTEURS ET SES UTILISATIONS

La présente Invention se rapporte à un procédé d'amplification de la formation de complexes entre les deux éléments d'un couple ligand/récepteur, à un  
5 procédé et à un appareil de détection de la présence, dans un échantillon (ci-après "échantillon analytique"), d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur, mettant en oeuvre ce procédé d'amplification, aux applications de ce procédé de détection, ainsi qu'à un procédé de détection de la présence, dans un signal électromagnétique, du signal électromagnétique  
10 caractéristique de l'activité biologique d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur, mettant également en oeuvre ledit procédé d'amplification.

Pour détecter la présence d'une substance dans un échantillon analytique, on a proposé de très nombreuses méthodes fondées sur la capacité de cette  
15 substance à se lier spécifiquement à une autre substance et à réagir avec elle.

En particulier, les propriétés d'affinité que présentent les anticorps vis-à-vis des antigènes sont à la base d'un grand nombre de méthodes immunologiques de détection qui ont en commun d'utiliser la formation de complexes antigènes-anticorps - la substance recherchée pouvant être soit l'antigène, soit l'anticorps - et de  
20 détecter, voire de quantifier, les complexes ainsi formés.

A titre d'exemples de méthodes immunologiques de détection qui sont très fréquemment utilisées, on peut citer l'immunoprécipitation, les réactions d'agglutination, la dialyse à l'équilibre, l'extinction de fluorescence, la polarisation de fluorescence, l'immunoélectrophorèse, la contre-immunoélectrophorèse ou  
25 électrosynérèse, les dosages radio-immunologiques (RIA), les dosages immuno-enzymatiques (ELISA) ou encore l'immunofluorescence.

Ces méthodes immunologiques de détection, si elles présentent incontestablement de grandes qualités, ne donnent toutefois pas totalement satisfaction.

En premier lieu, leur sensibilité (qui est définie par la concentration minimale de substance recherchée que ces méthodes détectent) est, dans la plupart des cas, insuffisante. Ainsi, BERZOFKY et BERKOWER (*Antigen-Antibody Interaction*, In : WE Paul, *Fundamental Immunology*, RAVEN PRESS, New-York, 1984, 595) ont montré que, pour ce qui concerne par exemple la détection des anticorps, à l'exception des tests de neutralisation des phages avec lesquels il est possible de détecter la présence d'une seule molécule d'anticorps mais dont l'usage est extrêmement limité, très peu de méthodes ont une sensibilité inférieure à 10 ng d'anticorps par ml d'échantillon.

Il est donc souhaitable de développer de nouvelles techniques qui permettent d'abaisser le seuil de détection d'une substance recherchée.

Par ailleurs, toutes les méthodes de détection immunologiques proposées à ce jour comprennent une étape qui consiste à incuber un volume déterminé - qui est généralement au minimum de 500 µl - du prélèvement à analyser avec un réactif spécifique et ce, pour chaque substance recherchée. De ce fait, elles présentent l'inconvénient de nécessiter, dès que l'analyse d'un prélèvement porte sur plusieurs substances - comme cela est très souvent le cas des analyses médicales à visée diagnostique -, un prélèvement d'un volume relativement important, ce qui n'est pas toujours bien supporté par les patients, notamment dans le cas de prélèvements sanguins.

De plus, le fait que ces méthodes de détection nécessite, pour leur mise en oeuvre, de disposer du prélèvement à analyser ou, à tout le moins, d'un échantillon de celui-ci, n'est pas sans présenter un certain nombre de contraintes. En effet :

— d'une part, il est fréquent que des prélèvements ayant donné lieu à des analyses doivent être conservés de manière à ce que la fiabilité de ces analyses puisse être contrôlée ultérieurement ou que des analyses complémentaires puissent être réalisées. Ainsi, par exemple, les centres de transfusion sanguine, les services de médecine légale et les centres de prélèvements tissulaires conservent des échantillons de tous les prélèvements biologiques qu'ils sont amenés à effectuer. Cette

conservation, qui est réalisée par congélation desdits échantillons, outre d'avoir un coût non négligeable, nécessite des équipements et des locaux adaptés.

— d'autre part, il est également fréquent que des prélèvements ne puissent pas être analysés sur le lieu où ils ont été réalisés et qu'il soit nécessaire de les acheminer jusqu'au laboratoire chargé d'en effectuer l'analyse. Or, l'acheminement de prélèvements biologiques, outre qu'il n'est jamais très aisé à mettre en oeuvre en raison de la faible durée de conservation des substances biologiques en l'absence de congélation, pose un certain nombre de difficultés lorsque ces prélèvements sont potentiellement contaminants. De plus, la durée d'un tel acheminement diffère d'autant l'obtention des résultats de l'analyse.

Le problème se pose, par conséquent, de fournir une méthode qui permette de détecter la présence d'une substance dans un échantillon avec, à la fois, une très grande sensibilité et une haute spécificité, tout en offrant la possibilité d'effectuer autant d'analyses que nécessaires à partir de microprelèvements, de s'affranchir, de plus, des contraintes de conservation, d'expédition et de transport des prélèvements que présentent les méthodes actuellement utilisées pour la détection d'une substance, et qui puisse, en outre, être mise en oeuvre aisément et rapidement sans nécessiter un équipement lourd et onéreux.

Or, dans le cadre de leurs travaux sur la transmission d'une activité biologique sous la forme d'un signal électromagnétique, les Inventeurs ont constaté que l'application, à l'un et/ou l'autre des éléments d'un couple ligand/récepteur tel qu'un couple antigène/anticorps, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre de ces éléments a, de façon tout à fait surprenante, pour effet d'amplifier la formation de complexes entre les deux éléments de ce couple lorsque ces derniers sont mis à réagir ensemble et ce, de manière très spécifique, et ont eu l'idée de mettre à profit cet effet pour détecter d'une part, la présence d'une substance dans un échantillon analytique et, d'autre part, la présence du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance dans un rayonnement électromagnétique.

La présente Invention a, donc, pour objet un procédé d'amplification de la formation de complexes entre les deux éléments d'un couple ligand récepteur par réaction de ces deux éléments, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact des deux éléments du couple ligand/récepteur dans des conditions propres à permettre leur réaction, et
- préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application à l'un et/ou l'autre de ces éléments du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre desdits éléments.

Au sens de la présente Invention, on entend par "couple ligand/récepteur", tout couple formé par deux substances capables de se reconnaître spécifiquement, de se lier et de réagir ensemble en formant des complexes. Ainsi, il peut s'agir d'un couple antigène/anticorps ou haptène/anticorps dans lequel le ligand (l'antigène ou l'haptène) peut être un composé biologique (protéine, enzyme, hormone, toxine, marqueur tumoral, ...), un composé chimique (principe actif médicamenteux par exemple), ou un antigène cellulaire ou particulaire (cellule, bactérie, virus, champignon, ...), le récepteur pouvant être un anticorps soluble ou un récepteur membranaire. Il peut également s'agir d'un couple formé par une enzyme et son substrat spécifique.

Par ailleurs, on entend par "signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique" d'un élément, le signal électromagnétique capté à partir d'un élément biologiquement actif tel qu'une substance, une cellule ou un micro-organisme, ..., ou d'une matière contenant cet élément tel qu'une préparation purifiée, un prélèvement biologique, un organe ou un être vivant, ainsi que cela a été décrit dans la Demande Internationale WO 94/17406 au nom de J. BENVENISTE. On entend également par "signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique" d'un élément, les signaux dérivés d'un signal tel que défini ci-dessus par numérisation et/ou traitement de signal. Par ailleurs, dans cette expression, on emploie le terme "caractéristique" dans le sens où le signal électromagnétique capté contient une information caractérisant le fait que la matière à partir de laquelle est capté ce signal présente l'activité biologique en question. Le signal électromagnétique capté à partir

d'un matériel contenant une pluralité d'éléments biologiquement actifs présente l'activité biologique de chacun des éléments qu'il contient.

Selon un premier mode de mise en œuvre préféré du procédé d'amplification conforme à l'invention, la réaction entre le ligand et le récepteur est réalisée en utilisant deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, et on applique, à l'un et/ou l'autre de ces réactifs, un signal électromagnétique à tester et suspecté comprendre le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de ce ligand et/ou de ce récepteur.

Dans ce qui précède et dans ce qui suit, on désigne sous le terme de "réactif", toute préparation dont la composition est connue, qui contient le ligand ou le récepteur en une quantité également connue et se présente soit sous une forme sèche telle qu'un lyophilisat à reconstituer dans un solvant, soit sous une forme liquide telle qu'une solution ou une suspension, le ligand ou le récepteur pouvant être fixé sur une phase solide (particules ou billes de latex, de verre ou de polystyrène, ...).

Selon une première disposition avantageuse de ce premier mode de mise en œuvre, l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant l'un et/ou l'autre de ces réactifs, à ce signal électromagnétique.

En variante, l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par dilution d'une solution ou d'une suspension comprenant l'un et/ou l'autre de ces réactifs, dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce signal électromagnétique.

Ainsi, par exemple, lorsque les réactifs que l'on souhaite utiliser sont en solution ou en suspension dans une phase liquide, il est possible de leur appliquer le signal électromagnétique à tester :

\* soit préalablement à leur utilisation :

- en exposant l'un et/ou l'autre de ces réactifs ou des aliquotes de l'un et/ou l'autre de ces réactifs à ce signal électromagnétique, ou
- en diluant l'un et/ou l'autre desdits réactifs ou leurs aliquotes dans un volume d'un solvant ayant été préalablement exposé au dit signal électromagnétique,

\* soit lors de la mise en oeuvre du procédé d'amplification conforme à l'Invention :

- en exposant à ce signal électromagnétique un aliquote de chacun de ces réactifs, après dépôt de ces aliquotes sur un support (lame par exemple) mais préalablement à leur mise en contact, ou
- en mélangeant un aliquote du premier réactif avec un aliquote du deuxième réactif sur un support ou dans un tube, et en exposant ce mélange au signal électromagnétique, ou encore
- en mélangeant un aliquote du premier réactif avec un aliquote du deuxième réactif sur un support ou dans un tube et en diluant ce mélange dans un volume d'un solvant ayant été préalablement exposé audit signal électromagnétique.

Selon une autre disposition avantageuse de ce premier mode de mise en oeuvre, l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par dissolution ou mise en suspension de ce ou ces réactifs dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce signal électromagnétique. Cette disposition présente un intérêt tout particulier lorsque les réactifs que l'on souhaite utiliser, se trouvent sous une forme déshydratée telle qu'un lyophilisat, puisqu'il est alors possible de leur appliquer le signal électromagnétique à tester simplement en les dissolvant ou en les mettant en suspension selon le cas, dans un volume d'un solvant ayant été préalablement exposé à ce signal électromagnétique.

Avantageusement, le signal électromagnétique à tester est un signal électromagnétique capté à partir d'un échantillon à analyser et suspecté contenir ce ligand et/ou ce récepteur, cet échantillon pouvant être aussi bien issu d'un prélèvement biologique (sang, urine, lait, ...) que d'un prélèvement non biologique (eau, produit alimentaire, produit pharmaceutique, produit cosmétique, ...).

En variante, le signal électromagnétique à tester peut également être un signal électromagnétique rayonné par une source de rayonnement électromagnétique, notamment une source suspectée émettre un rayonnement nocif pour les être vivants du type ligne haute-tension, transformateur, moteur électrique, four à micro-ondes, accélérateur de particules, source de rayons X, ... De même, le



signal électromagnétique à tester peut provenir de l'acquisition d'un signal mécanique comme des vibrations, d'un signal électrostatique ou autre.

Selon un deuxième mode de mise en oeuvre préféré du procédé d'amplification conforme à l'Invention, la réaction entre le ligand et le récepteur est réalisée en mettant en contact un échantillon à analyser et suspecté contenir le ligand et/ou le récepteur, avec un réactif contenant soit le récepteur, soit le ligand (selon la substance suspectée être présente dans l'échantillon analytique avec laquelle on souhaite faire réagir ce réactif), et on applique, à cet échantillon et/ou à ce réactif, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit ligand et/ou dudit récepteur.

Selon une première disposition avantageuse de ce deuxième mode de mise en oeuvre, l'application, à l'échantillon à analyser, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur est réalisée par exposition de cet échantillon à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou par dilution de cet échantillon dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétique(s).

Selon une autre disposition avantageuse de ce deuxième mode de mise en oeuvre, l'application, au réactif destiné à réagir avec l'échantillon à analyser, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur est réalisée par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant ce réactif à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou par dilution d'une telle solution ou suspension dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou encore par dissolution ou mise en suspension de ce réactif dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétique(s).

En variante, on applique, à l'échantillon à analyser et au réactif destiné à réagir avec lui, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur, par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant cet échantillon et ce réactif à ce ou ces signaux électro-

magnétiques, ou par dilution d'une telle solution ou suspension dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétique(s).

Selon une disposition particulièrement préférée de ce deuxième mode de mise en oeuvre, on applique, à l'échantillon à analyser et ou au réactif destiné à réagir avec lui, à la fois le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du récepteur. En effet, les Inventeurs ont constaté que, s'il suffit d'appliquer, aux éléments du couple ligand/récepteur, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un seul de ces éléments pour obtenir une amplification des complexes formés par leur réaction, cette amplification est plus élevée lorsqu'on applique à ces éléments simultanément les signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique de chacun d'eux.

Quel que soit le mode de mise de oeuvre du procédé d'amplification conforme à l'Invention, le solvant ayant été préalablement exposé au(x) signal(aux) électromagnétique(s) est avantageusement de l'eau ou du soluté physiologique.

Les réactifs susceptibles d'être utilisés dans le procédé d'amplification conforme à l'Invention et contenant le ligand d'une part, et le récepteur d'autre part, peuvent être aussi bien des réactifs prêts à l'emploi disponibles dans le commerce que des réactifs spécialement conçus et préparés pour la mise en oeuvre de ce procédé. Outre le fait que, comme mentionné ci-avant, ces réactifs peuvent se présenter sous différentes formes (sèche, liquide, ...), ils peuvent, par ailleurs, être couplés à un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme, une substance fluorescente, une particule colorée, la biotine ou un composé organométallique, propre à permettre la détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs résultant de la réaction entre le ligand et le récepteur.

Le procédé d'amplification comprend avantageusement, de plus, une étape d'acquisition du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre des éléments du couple ligand/récepteur.

Comme précédemment indiqué, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre des éléments du couple

ligand/récepteur peut provenir soit d'un échantillon à analyser et suspecté contenir ce ou ces éléments, soit d'une source de rayonnement électromagnétique ou de l'acquisition d'un signal mécanique (vibrations), électrostatique ou autre, soit encore de réactifs contenant le ligand ou le récepteur en solution ou en suspension dans un solvant, selon les modes de mises en oeuvre du procédé d'amplification conforme à l'Invention.

De manière particulièrement avantageuse, le procédé d'amplification conforme à l'Invention comprend, également, une étape d'enregistrement et de restitution d'une information représentative du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre des éléments du couple ligand/récepteur. Ainsi, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un échantillon analytique, une fois enregistré, peut être conservé indéfiniment et utilisé autant de fois que nécessaire. De manière similaire, les signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique du ligand et de l'activité biologique du récepteur captés à partir de réactifs, peuvent être enregistrés une fois pour toutes et être utilisés pour effectuer une pluralité de réactions mettant en jeu ce ligand et ce récepteur.

Le procédé d'amplification comprend avantageusement, en outre, une étape de détection des complexes résultant de la réaction entre le ligand et le récepteur et, éventuellement, de mesure de ces complexes. Cette étape peut, avantageusement, être complétée par la comparaison des résultats obtenus avec ceux observés pour une réaction servant de "témoin", c'est-à-dire une réaction conduite avec le même couple ligand/récepteur et dans les mêmes conditions réactionnelles, mais sans application d'un signal électromagnétique aux éléments de ce couple, que ce soit préalablement, simultanément ou postérieurement à leur mise en contact.

La détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs sont susceptibles d'être effectuées par toutes les méthodes classiquement utilisées pour révéler et quantifier la formation de tels complexes. Ainsi, dans le cas de complexes antigènes-anticorps, il est possible d'utiliser aussi bien une révélation par agglutination, par immunoprécipitation, par extinction de fluorescence, par

polarisation de fluorescence qu'un test radio-immunologique, immuno-enzymatique ou encore un test d'immuno-fluorescence.

Selon un mode de mise en oeuvre particulièrement préféré du procédé d'amplification conforme à l'Invention, le ligand est un antigène ou un haptène, tandis que le récepteur est un anticorps ou un récepteur membranaire dirigé spécifiquement contre ce ligand.

De manière particulièrement avantageuse, la réaction entre ce ligand et ce récepteur est une réaction révélée par agglutination, du fait de sa simplicité et de sa rapidité d'exécution.

La présente Invention a, également, pour objet un procédé de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon analytique, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification tel que défini ci-avant.

Selon un premier mode de mise en oeuvre particulièrement préféré de ce procédé de détection, celui-ci comprend :

- la mise en contact de deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, dans des conditions propres à permettre leur réaction,
- préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application, à l'un et/ou l'autre de ces réactifs, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon analytique, et
- la détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs formés au cours de la réaction entre les deux réactifs.

Ainsi, l'obtention d'une amplification de la formation de complexes ligands-récepteurs entre les deux réactifs par rapport à une réaction "témoin" (telle que précédemment définie) traduit la présence, dans le signal électromagnétique de l'activité biologique de l'échantillon à analyser, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de la substance recherchée et, par voie de conséquence, traduit la présence, dans cet échantillon, de la substance recherchée.

Dans le cas où une telle amplification est obtenue et où l'échantillon analytique est susceptible de contenir non pas un seul des deux éléments du couple

ligand-récepteur, mais ces deux éléments, la présence, dans cet échantillon, de la substance recherchée peut être confirmée par la comparaison des résultats obtenus avec :

- soit ceux observés pour une réaction conduite dans les mêmes conditions réactionnelles mais avec une application à la fois du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon à analyser et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand,
- soit ceux observés pour une réaction conduite dans les mêmes conditions réactionnelles mais avec une application à la fois du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon à analyser et du signal caractéristique de l'activité biologique du récepteur.

Ainsi, si l'application simultanée du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon analytique et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand se traduit par une amplification de la formation des complexes ligands-récepteurs par rapport à l'application du seul signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit échantillon analytique, alors cela signifie que cet échantillon ne contient pas de ligand et donc ne contient que le récepteur. L'absence d'augmentation de la formation des complexes ligands-récepteurs signant, elle, la présence du ligand dans l'échantillon analytique.

De manière similaire, si l'application simultanée du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon analytique et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du récepteur se traduit par une amplification de la formation des complexes ligands-récepteurs par rapport à l'application du seul signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit échantillon analytique, alors il peut en être déduit que cet échantillon ne contient pas de récepteur et donc ne contient que le ligand. L'absence d'augmentation de la formation des complexes ligands-récepteurs signant, elle, la présence du récepteur dans l'échantillon.

Afin d'éviter d'obtenir des résultats faussement négatifs, c'est-à-dire des résultats qui ne permettraient pas de révéler un effet d'amplification de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité de l'échantillon analytique et ce, bien que ce dernier contienne en réalité la substance recherchée, les concentrations du ligand et du récepteur mis à réagir sont avantageusement choisies de manière à être suffisantes pour conduire à l'obtention de complexes ligands-récepteurs détectables en l'absence de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit échantillon, mais inférieures aux concentrations susceptibles d'aboutir à une saturation de la réaction entre ce ligand et ce récepteur.

Selon un deuxième mode de mise en oeuvre préféré de ce procédé de détection, celui-ci comprend :

- la mise en contact de l'échantillon analytique avec un réactif contenant soit le récepteur, si la substance recherchée dans l'échantillon est le ligand, soit le ligand, si la substance recherchée dans l'échantillon est le récepteur, dans des conditions propres à permettre leur réaction,
- préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application, à cet échantillon et/ou ce réactif, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur, et
- la détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs éventuellement formés, auquel cas, l'obtention de complexes ligands-récepteurs traduit la présence de la substance recherchée dans l'échantillon analytique.

Ce deuxième mode de mise en oeuvre préféré présente un intérêt tout particulier pour détecter la présence de substances dans des échantillons, dont on sait qu'elles ne sont pas détectables ou que très difficilement par les autres méthodes de détection disponibles, en raison de ce que ces substances sont généralement présentes à des concentrations très faibles, voire à l'état de traces.

Le procédé de détection de la présence d'une substance dans un échantillon analytique conforme à l'Invention présente de nombreux avantages.

En effet, d'une part, il permet de détecter la présence d'une substance recherchée avec une très grande sensibilité et une haute spécificité. De ce fait, dans le

cas, par exemple, d'une analyse bactériologique, il permet de supprimer la nécessité d'isoler les différents germes, de les cultiver, de procéder à un antibiogramme et d'identifier ces germes par leurs caractères biochimiques, morphologiques et immunologiques, et autorise l'obtention de résultats beaucoup plus rapidement que les  
5 méthodes de détection immunologiques actuellement utilisées en bactériologie.

D'autre part, dans la mesure où il suffit de disposer d'un échantillon de la taille d'une goutte pour être en mesure d'acquérir et d'enregistrer le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de cet échantillon et où, ce signal, une fois enregistré peut être restitué à la demande, ce procédé offre la  
10 possibilité de réaliser autant d'analyses que l'on souhaite à partir d'un microprélèvement.

Enfin, l'enregistrement d'un signal électromagnétique pouvant être conservé indéfiniment, par exemple sous la forme d'un fichier informatique susceptible d'être conservé sur une simple disquette ou un CD-Rom, et d'être transmis  
15 d'un lieu à un autre par tout moyen de transmission de données numériques, ce procédé permet, de plus, de supprimer toutes les contraintes de conservation, d'expédition et de transport des prélèvements que présentent les méthodes actuellement utilisées pour la détection d'une substance.

Ce procédé est susceptible d'être utilisé pour détecter toute substance  
20 capable de se lier spécifiquement avec une autre substance et de réagir avec elle, étant entendu que le terme "substance" tel qu'il est utilisé ici, désigne aussi bien un composé biologique, un composé chimique, une cellule qu'un micro-organisme du type bactérie, virus ou champignon, sachant notamment que pour tout haptène, protéine ou complexe protéinique, il est possible de trouver sur le marché ou de faire fabriquer les  
25 anticorps correspondants. A ce titre, ce procédé trouve, notamment, application dans le diagnostic biologique, que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire, ou pour le contrôle de qualité bactériologique dans les industries telles que l'industrie pharmaceutique, l'industrie cosmétique, les productions et industries alimentaires.

La présente Invention a, encore, pour objet un procédé de détection  
30 de la présence, dans un signal électromagnétique à tester, d'un signal

électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand récepteur, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification tel que défini ci-avant.

5                    Selon un mode de mise en oeuvre préféré de ce procédé de détection, le signal électromagnétique à tester est le signal électromagnétique rayonné par une source de rayonnement électromagnétique.

                  L'Invention a, aussi, pour objet un appareil de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple  
10    ligand/récepteur dans un échantillon analytique, lequel appareil est caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un procédé selon l'Invention et en ce qu'il comporte :

                  a) des moyens de réception de l'échantillon analytique et d'un réactif contenant soit le récepteur, soit le ligand, permettant leur mise en contact dans des conditions propres à permettre leur réaction ;

15                    b) une source de signal électromagnétique caractéristique de l'activité du ligand et/ou du récepteur ;

                  c) des moyens d'application du signal délivré par ladite source de signal électromagnétique à l'échantillon et/ou le réactif ; et

20                    d) des moyens de détection et/ou de mesure des complexes ligands-récepteurs formés au cours de la réaction entre l'échantillon et le réactif.

                  L'Invention a, en outre, pour objet un appareil de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon analytique, lequel appareil est caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un procédé selon l'Invention et en ce qu'il comporte :

25                    a) des moyens de réception de deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, permettant leur mise en contact dans les conditions propres à permettre leur réaction ;

                  b) des moyens d'acquisition d'un signal électromagnétique de l'échantillon analytique ;



c) des moyens d'application du signal délivré par lesdits moyens d'acquisition de signal électromagnétique à l'un et/ou l'autre des réactifs ; et

d) des moyens de détection et/ou de mesure des complexes ligands-récepteurs formés en cours de la réaction entre les deux réactifs.

5 Selon un mode de réalisation avantageux de ces appareils, les moyens de détection comportent des moyens de détection optique.

De manière préférée, ces appareils comportent une enceinte munie d'un blindage électrique et magnétique entourant lesdits moyens de réception.

10 Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront du complément de description qui suit, qui se rapporte à des exemples de réalisation de dispositifs d'acquisition, d'enregistrement et d'application de signal susceptibles d'être utilisés selon l'Invention ainsi qu'à des exemples d'expérimentations ayant permis de valider le procédé d'amplification objet de la présente Invention, et qui se réfère aux dessins annexés dans lesquels :

15 - la Figure 1 représente un schéma d'un premier exemple de réalisation d'un dispositif d'acquisition de signal susceptible d'être utilisé selon la présente Invention ;

- la Figure 2 représente un schéma d'un deuxième exemple de réalisation d'un dispositif d'acquisition de signal susceptible d'être utilisé selon la  
20 présente Invention ;

- la Figure 3 représente un schéma d'un premier exemple de réalisation d'un dispositif d'enregistrement de signal susceptible d'être utilisé selon la présente Invention ;

- la Figure 4 représente un schéma d'un deuxième exemple de réalisation d'un dispositif d'enregistrement de signal susceptible d'être utilisé selon la  
25 présente Invention ;

- la Figure 5 représente un schéma d'un exemple de réalisation d'un dispositif d'application de signal susceptible d'être utilisé conformément à l'Invention ;

- la Figure 6 montre une image noir et blanc de 320 pixels x 240  
30 pixels des agglutinats formés au cours d'une réaction d'agglutination entre l'antigène

polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps dirigé contre cet antigène, après application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus* ;

5       – la Figure 7 montre une image noir et blanc de 320 pixels x 240 pixels des agglutinats formés au cours d'une réaction d'agglutination entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps dirigé contre cet antigène, après application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli* ;

10       – la Figure 8 montre une image noir et blanc de 320 pixels x 240 pixels des agglutinats formés au cours d'une réaction d'agglutination entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps dirigé contre cet antigène, après application simultanée des signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique de *Streptococcus* et de l'activité biologique d'un anticorps dirigé contre *Escherichia coli* ;

15       – la Figure 9 montre une image noir et blanc de 320 pixels x 240 pixels des agglutinats formés également au cours d'une réaction d'agglutination entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps dirigé contre cet antigène, après application simultanée des signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique d'*Escherichia coli* et de l'activité biologique de son anticorps spécifique ; et

20       – la Figure 10 représente un schéma d'un exemple de réalisation d'un dispositif de détection et/ou de mesure des complexes ligands-récepteurs susceptible d'être utilisé selon la présente Invention.

25       Sur les Figures 1 à 5 et 10, on a utilisé les mêmes références pour désigner les mêmes éléments.

Par ailleurs, chaque image des Figures 6 à 9 correspond à une surface d'environ 2 mm x 1,5 mm du support sur lequel ont été réalisées les réactions d'agglutination.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustrations de l'objet de l'Invention et n'en constituent en aucune manière une limitation.

On se réfère tout d'abord aux Figures 1 à 5.

5 Sur la Figure 1, on a représenté schématiquement un premier exemple de réalisation d'un dispositif d'acquisition du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance 1 disposée dans un contenant 3, par exemple un tube à essai. Un capteur 5, typiquement une bobine de type "capteur téléphonique" commercialisé en vue d'être appliqué sur un écouteur téléphonique et  
10 relié à un magnétophone, est appliqué contre le contenant 3. Le contenant 3 peut également être constitué par une paroi biologique, notamment la peau d'un être vivant. Dans un tel cas, l'acquisition du signal électromagnétique s'effectue de manière non invasive.

Le signal recueilli par la bobine 5 est, avantageusement, amplifié par  
15 un amplificateur 7 et est disponible à une borne de sortie 9. Sans que cela présente un quelconque caractère limitatif de l'exemple illustré, une première extrémité de la bobine 5 est connectée à l'entrée de l'amplificateur-préamplificateur 7, l'extrémité opposée étant connectée à une masse 11. Dans un exemple de réalisation, la bobine 5 est un capteur téléphonique du commerce présentant une longueur de 6 mm, un  
20 diamètre interne de 6 mm contenant un noyau métallique, un diamètre externe de 16 mm et une impédance de 300  $\Omega$ .

Sur la Figure 2, on a représenté schématiquement l'exemple préféré de réalisation d'un dispositif d'acquisition du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance 1 contenue dans un contenant 3, dans lequel le  
25 dispositif comprend, de préférence, dans une enceinte 13 munie d'un blindage électrique et magnétique, un transducteur 15 d'irradiation de ladite substance 1 alimenté par un générateur 17. Le transducteur 15 comporte, par exemple, une bobine, avantageusement complétée par des guides d'ondes, par exemple, un entrefer (non représenté) placé au contact des parois extérieures du contenant 3.

Le générateur 17 génère un signal sinusoïdal basse fréquence, des signaux carrés basse fréquence, du bruit rose ou, avantageusement, du bruit blanc. Le spectre du signal d'excitation alimentant la bobine 15 correspond sensiblement au spectre des fréquences audibles (20 Hz - 20 000 Hz). Le générateur 17 peut être un

5   générateur de signal analogique de type connu ou, par exemple, une mémoire morte (ROM, PROM, EPROM, EEPROM en terminologie anglo-saxonne) contenant le signal numérique du bruit désiré et qui est reliée à un convertisseur numérique-analogique, ou la sortie ligne d'une carte sons d'un micro-ordinateur multimédia. Toutefois, la mise en oeuvre de fréquences supérieures ne sort pas du cadre de la

10   présente Invention.

Le capteur d'acquisition 5 peut comporter une bobine analogue à la bobine 5 du dispositif de la Figure 1 ou, avantageusement, une bobine de petit diamètre relié par un guide d'ondes électromagnétiques à la paroi du contenant 3. Avantageusement, le signal capté par le capteur 5 est disponible à une borne de sortie

15   9 d'un amplificateur-préamplificateur 7.

Le signal disponible sur la borne 9 peut être directement appliqué à la ou aux substances à irradier, notamment au ligand, au récepteur ou au couple ligand/récepteur (notamment à l'aide du dispositif illustré sur la Figure 5 et décrit ci-après).

L'enregistrement du signal peut être effectué en analogique par un

20   enregistreur de signal 19 (Figure 3), notamment sur bande magnétique 21 adapté aux fréquences du signal capté. Pour les fréquences acoustiques, on peut notamment utiliser un magnétophone. La borne de sortie 9 du dispositif d'acquisition de signal des Figures 1 ou 2 est reliée à l'entrée microphone ou à l'entrée ligne d'un tel

25   magnétophone. Lors de la lecture, le signal est recueilli à une borne de sortie 9', notamment à la sortie ligne ou à la sortie haut-parleur du magnétophone 19.

Avantageusement, on effectue un enregistrement numérique après conversion analogique-numérique du signal. On utilise, par exemple, un micro-ordinateur 23 illustré sur la Figure 4, muni d'une carte d'acquisition de signal 25. Il

30   s'agit par exemple d'un ordinateur de type PC, tournant sous le système d'exploitation

WINDOWS<sup>®</sup> 95 de la Société MICROSOFT et comportant, outre la carte d'acquisition 25, un microprocesseur 27, un interface d'entrée/sortie 29, un contrôleur 31 d'une mémoire de masse 33 et une interface vidéo 35 reliée par un ou plusieurs bus 37. La carte d'acquisition 25 comporte un convertisseur analogique 39 ayant, de préférence, une résolution supérieure à 10 bits, par exemple égale à 12 bits, ainsi qu'une fréquence d'échantillonnage double de la fréquence maximale que l'on veut pouvoir numériser pour le traitement de signaux. Dans les fréquences acoustiques, la fréquence d'échantillonnage est avantageusement sensiblement égale à 44 kHz. Pour le traitement de ces types de signaux, on utilise avantageusement une carte son pour micro-ordinateur, par exemple la carte Soundblaster 16 ou la carte Soundblaster 32 vendues par la Société CREATIVE LABS. L'ordinateur 23 muni de la carte d'acquisition de restitution 25, notamment d'une carte Soundblaster 32 peut avantageusement remplacer le générateur de signal 17 de la Figure 2.

On connecte la sortie 9 des dispositifs d'acquisition de signal des Figures 1 à l'entrée 9 du convertisseur analogique-numérique 39 de la carte 25 de l'ordinateur 23 ; on procède à une acquisition du signal pendant une durée par exemple comprise entre 1 et 60 s et on enregistre le fichier numérique dans une mémoire de masse 33, par exemple sous la forme d'un fichier son au format .WAV. Ce fichier peut éventuellement subir un traitement numérique, comme par exemple une amplification numérique pour calibrage du niveau de signal, un filtrage pour l'élimination de fréquences non désirées, ou être transformé en son spectre par une transformée de FOURIER discrète, de préférence par l'algorithme de transformée de FOURIER rapide (FTT en terminologie anglo-saxonne).

Le temps de reproduction sonore peut être augmenté en répétant dans un fichier plusieurs fois un fragment ou la totalité du fichier son original.

Sur commande, le fichier éventuellement traité est transformé par un convertisseur numérique-analogique 41 de la carte 25 (ou d'une carte séparée), qui délivre sur la sortie 9' le signal électromagnétique analogique caractéristique de l'activité biologique à appliquer, selon le procédé d'amplification conforme à

L'invention, par exemple à un aliquote 43 d'un premier réactif et à un aliquote 45 d'un deuxième réactif, comme illustré sur la Figure 5.

Avantageusement, l'application du signal à ces aliquotes est réalisée préalablement à leur mélange. Le support sur lequel sont déposés ces aliquotes, par exemple, une lame 47 munie d'un capillaire 49 en forme de serpent, est disposé dans un champ électromagnétique rayonné par un transducteur 51, typiquement une bobine dont une première extrémité 9, 9' est reliée à la sortie 9 d'un dispositif d'acquisition des Figures 1 ou 2 ou à la sortie 9' d'un dispositif d'enregistrement des Figures 3 ou 4. L'extrémité de la bobine opposée à la borne de connexion 9, 9' est, par exemple, connectée à la masse 11.

Sans que cela représente un quelconque caractère limitatif, le transducteur 51 comporte avantageusement une bobine, d'axe horizontal permettant l'introduction de la lame 47. La bobine a, par exemple, une longueur de 120 mm, un diamètre interne de 25 mm, un diamètre extérieur de 28 mm, présente 631 tours d'un fil de diamètre 0,5mm et une résistance de 4,7  $\Omega$ .

Avantageusement, le signal électrique appliqué sur cette bobine 51 aura une amplitude de 2 volts efficaces.

**EXEMPLE 1 : AMPLIFICATION DE LA FORMATION D'AGGLUTINATS ENTRE L'ANTIGENE POLYSACCHARIDIQUE D'*ESCHERICHIA COLI* K1 ET UN ANTICORPS DIRIGÉ CONTRE CET ANTIGÈNE**

Le procédé d'amplification conforme à l'invention a été validé en testant les effets, sur une réaction d'agglutination entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps dirigé contre cet antigène :

- de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance antigénique étrangère à cette réaction telle que *Streptococcus*,
- de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli*,

- de l'application simultanée du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus* et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un anticorps dirigé contre *Escherichia coli*, et enfin

5 - de l'application simultanée du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli* et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un anticorps dirigé contre cet antigène.

### 1) Réalisation des tests :

#### 10 a) Acquisition des signaux électromagnétiques :

L'acquisition des signaux électromagnétiques caractéristiques des activités biologiques de *Streptococcus*, d'*Escherichia coli* et de son anticorps spécifique a été réalisée au moyen du matériel d'enregistrement de la Figure 2.

L'acquisition du signal électromagnétique caractéristique de l'activité  
15 biologique de *Streptococcus* a été effectuée en plaçant au centre de l'enceinte 13 un tube contenant 1 ml d'une suspension aqueuse de bactéries *Streptococcus* préalablement formolées ( $6.10^6$  bactéries/ml).

L'acquisition des signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique d'*Escherichia coli* et de son anticorps spécifique a été réalisée en  
20 opérant de la même manière, mais en utilisant respectivement :

- un tube contenant 1 ml d'une suspension aqueuse de bactéries *Escherichia coli* préalablement formolées ( $6.10^6$  bactéries/ml) ; et

- un tube contenant 1 ml d'une suspension de particules d'un latex sensibilisé par un anticorps monoclonal de souris spécifique d'*Escherichia coli* K1, provenant d'une trousse PASTOREX® MENINGITIS (Référence 61709 - SANOFI  
25 DIAGNOSTICS PASTEUR).

#### b) Préparation des réactifs de la réaction d'agglutination :

Les tests ont été réalisés en utilisant comme réactifs :

- d'une part, une solution d'antigène polysaccharidique  
30 d'*Escherichia coli* K1 préparée par dissolution d'un extrait antigénique provenant

d'une trousse PASTOREX<sup>®</sup> MENINGITIS (Référence 61709 - SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR) dans 1 ml d'eau distillée et stérile, puis dilution au 1/7, 1/7.5 ou 1/8 dans du sérum physiologique ; et

- d'autre part, le latex sensibilisé par un anticorps monoclonal de souris spécifique de l'anticorps d'*Escherichia coli* K1 présent dans cette même trousse, après dilution au 1/3 dans du sérum physiologique.

c) Application des signaux électromagnétiques à la réaction d'agglutination :

Pour chacun des tests, on a utilisé le protocole suivant :

- on place dans une étuve chauffée à 37°C un transducteur constitué par une bobine mesurant 120 mm de long et 25 mm de diamètre interne, présentant 631 tours et une résistance de 4,7  $\Omega$ , et reliée à la sortie 9' du convertisseur numérique-analogique 41 d'une carte Soundblaster d'un ordinateur 23 restituant les fichiers d'enregistrement constitué par les signaux électromagnétiques que l'on souhaite appliquer, le temps nécessaire pour amener ce transducteur à la température de 37°C ;

- on dépose sur une lame munie d'un capillaire en forme de serpent (de type de celles fournies dans les kits PASTOREX MENINGITIS), à faible distance de l'ouverture de ce dernier, une goutte (soit 40 à 50  $\mu$ l) de la solution antigénique telle que décrite au point b) ci-avant, ainsi qu'une goutte (correspondant également à un volume de 40 à 50  $\mu$ l) du latex sensibilisé par l'anticorps, en prenant garde à ce que ces gouttes ne se mélangent pas ;

- on applique, aux deux gouttes de réactifs ainsi déposées, le ou les signaux électromagnétiques désirés en plaçant la lame au centre du transducteur pendant environ 2 mn et en restituant un fichier son à l'aide de l'ordinateur 23 de la Figure 4 ;

- on mélange les deux gouttes de réactifs pendant environ 10 secondes et on laisse pendant environ 13 minutes dans l'étuve le mélange réactionnel migrer dans le capillaire et la réaction d'agglutination se produire ;

- on sort alors la lame de l'étuve et on procède à une lecture de cette agglutination.



Comme visible sur la Figure 10, cette lecture est réalisée par analyse, au moyen d'un logiciel d'analyse et de traitement d'images implémenté sur un ordinateur de type PC 23' tournant sous le système d'exploitation WINDOWS<sup>®</sup> 95 (MICROSOFT), d'une image acquise à l'aide d'une caméra vidéo 53 positionnée sur un microscope optique 55 et connectée audit ordinateur par une carte d'acquisition vidéo 57. La caméra 53 travaille en niveaux de gris. Un premier traitement augmentant le contraste, le seuil étant réglé de manière à ce que les agglutinats apparaissent en noir, tandis que les zones dépourvues de particules de latex ou d'agglutinats apparaissent en blanc.

A partir de l'analyse de la répartition spatiale bidimensionnelle des zones sombres de l'image, l'ordinateur détermine un index d'agglutination (I) calculé selon la formule :

$$I = \frac{\text{Surface occupée par les agglutinats de taille supérieure à 60 pixels}}{\text{Surface occupée par les agglutinats de taille égale ou inférieure à 60 pixels}}$$

Cet index d'agglutination est d'autant plus élevé que la taille des agglutinats formés au cours de la réaction d'agglutination est plus importante. L'amplification est considérée comme positive lorsque, lors d'une expérience, l'application des signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique d'*Escherichia coli* et/ou de l'activité biologique de son anticorps spécifique conduit à l'obtention d'index d'agglutination au moins supérieurs de 40% à l'index d'agglutination maximal obtenu, dans les mêmes conditions, et sur par exemple 3 expériences, après application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus*.

## 2) Résultats :

Le Tableau 1 ci-après présente les index d'agglutination (I) obtenus dans une première série de tests visant à comparer les effets de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli* à ceux observés après application, dans les mêmes conditions réactionnelles, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus*, et ce, pour

3 dilutions différentes (1/7, 1/7,5 et 1/8) de la solution d'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 utilisée comme réactif dans les réactions d'agglutination.

TABLEAU 1

Dilution de la solution d'antigène <i>E. coli</i> K1	Index d'agglutination (I)	
	Signal <i>Streptococcus</i>	Signal <i>E. coli</i>
1/7	11	173
	6	52
	16	154
1/7,5	58	141
	32	117
	12	107
1/8	10	113
	6	37
	8	21

5

Par ailleurs, les Figures 6 et 7 montrent, à titre d'exemples, des images des agglutinats formés d'une part, après application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus* (Figure 6) et, d'autre part, après application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli* (Figure 7). Ces images correspondent respectivement aux index d'agglutination de 32 et de 117 qui sont rapportés à la 5ème ligne de résultats du Tableau 1.

10

Le Tableau 2 ci-dessous présente, quant à lui, les index d'agglutination (I) obtenus dans une deuxième série d'expérimentations dans le cadre de laquelle les effets de l'application simultanée du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli* et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'anticorps dirigé contre *Escherichia coli*, ont été comparés à ceux de l'application simultanée, dans les mêmes conditions réactionnelles, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus* et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité

15

20

biologique de l'anticorps dirigé contre *Escherichia coli* et ce, pour 2 dilutions différentes (1/7 et 1/7,5) de la solution d'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 utilisée comme réactif.

TABLEAU 2

Dilution de la solution d'antigène <i>E. coli</i> K1	Index d'agglutination (I)	
	Signal <i>Streptococcus</i> + Signal anticorps anti- <i>E. coli</i>	Signal <i>E. coli</i> + Signal anticorps anti- <i>E. coli</i>
1/7	18	94
	71	247
1/7,5	48	212
	93	1141

Les Figures 8 et 9 montrent, également à titre d'exemples, des images des agglutinats qui correspondent respectivement aux index d'agglutination de 71 et de 247 rapportés à la 2ème ligne de résultats du Tableau 2.

Tous ces résultats mettent clairement en évidence l'aptitude que présente le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un élément d'un couple ligand/récepteur, à amplifier la formation des complexes formés par la réaction entre ce ligand et ce récepteur et ce, de manière très spécifique, puisque le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un élément biologiquement actif, mais étranger à cette réaction ne produit, lui, pas d'effet d'amplification.

Ils montrent également que cette amplification est d'autant plus prononcée que l'on applique, aux deux éléments du couple ligand/récepteur, à la fois le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de ce ligand et le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de ce récepteur.

## EXEMPLE 2 : DETECTION DE LA PRESENCE D'ESCHERICHIA COLI DANS UN ECHANTILLON

L'intérêt de l'utilisation du procédé d'amplification conforme à l'Invention pour la détection d'une substance présente dans un échantillon analytique a été vérifiée en effectuant une série de tests visant à comparer les effets de l'application, sur une réaction d'agglutination entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps monoclonal de souris spécifique de cet antigène identique à celle mise en œuvre dans l'exemple 1 ci-avant, du signal électromagnétique capté à partir d'un échantillon d'un produit alimentaire, en l'espèce une compote de pommes, préalablement contaminé par des bactéries *Escherichia coli*, avec ceux obtenus lors de l'application, dans les mêmes conditions réactionnelles, du signal électromagnétique capté à partir d'un échantillon témoin, c'est-à-dire non contaminé, du même produit alimentaire.

### 1) Réalisation des tests :

L'acquisition des signaux électromagnétiques des échantillons de compote de pommes (échantillons témoins et échantillons contaminés) a été réalisée au moyen du matériel d'enregistrement de la Figure 2, en plaçant au centre de l'enceinte 13 :

- dans le cas des échantillons témoins, un tube contenant 1 ml de compote préalablement diluée au 1/2 avec du sérum physiologique, et
- dans le cas des échantillons contaminés, un tube contenant 1 ml de compote préalablement diluée au 1/2 avec du sérum physiologique et contaminée, par addition de bactéries *Escherichia coli* préalablement formolées, à raison de  $3 \cdot 10^6$  bactéries par ml de compote diluée.

Les tests ont été réalisés en utilisant comme réactifs :

- d'une part, une suspension contenant des bactéries *Escherichia coli* préalablement formolées dans du sérum physiologique, à raison de  $10^7$  bactéries/ml, et

– d'autre part, le latex sensibilisé par un anticorps monoclonal de souris spécifique de l'anticorps d'*Escherichia coli* K1 présent dans cette même trousse, après dilution au 1/3 dans du sérum physiologique, et en suivant un protocole opératoire identique à celui décrit au paragraphe c) de l'exemple 1 ci-avant.

## 2) Résultats :

Le Tableau 3 ci-après présente les index d'agglutination (I) obtenus dans trois séries de tests.

**TABLEAU 3**

Tests	Index d'agglutination (I)	
	Echantillons témoins	Echantillons contaminés
Série 1	10	42
	25	93
	27	104
Série 2	14	30
	17	153
	46	40
Série 3	19	54
	34	314

Comme visible sur le Tableau 3, la taille des agglutinats formés au cours de la réaction entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et son anticorps spécifique est substantiellement plus élevée dans le cas où le signal électromagnétique appliqué au cours de cette réaction a été capté à partir d'un échantillon de compote de pommes contaminé par des bactéries *Escherichia coli*.

Ces résultats montrent que le procédé d'amplification conforme à l'Invention peut avantageusement être utilisé pour détecter la présence, dans un échantillon analytique, d'une substance biologiquement active telle qu'une bactérie, même lorsque cet échantillon présente une composition complexe, c'est-à-dire qu'il

renferme, comme dans le cas des échantillons de compote de pommes, de nombreuses autres substances biologiquement actives.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'Invention ne se limite nullement aux formes de réalisation qui viennent d'être décrites de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente Invention.

## REVENDICATIONS

1. Procédé d'amplification d'une réaction entre les deux éléments d'un couple ligand récepteur, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact des deux éléments du couple ligand récepteur dans des conditions propres à permettre leur réaction, et
- préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application à l'un et/ou l'autre de ces éléments du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre desdits éléments.

2. Procédé d'amplification selon la revendication 1, caractérisé en ce que la réaction entre le ligand et le récepteur est réalisée en mettant en contact deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, et on applique, à l'un et/ou l'autre de ces réactifs, un signal électromagnétique à tester et suspecté comprendre le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de ce ligand et/ou de ce récepteur.

3. Procédé d'amplification selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant l'un ou l'autre de ces réactifs à ce signal électromagnétique.

4. Procédé d'amplification selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par dilution d'une solution ou d'une suspension comprenant l'un et/ou l'autre de ces réactifs, dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce signal électromagnétique.

5. Procédé d'amplification selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par dissolution ou mise en suspension de ce ou ces réactifs dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce signal électromagnétique.

6. Procédé d'amplification selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisé en ce que le solvant ayant été préalablement exposé au

signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon à analyser est de l'eau ou du soluté physiologique.

7. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que le signal électromagnétique à tester est le signal électromagnétique capté à partir d'un échantillon à analyser et suspecté contenir le ligand et/ou le récepteur.

8. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que le signal électromagnétique à tester est le signal électromagnétique rayonné par une source de rayonnement électromagnétique.

9. Procédé d'amplification selon la revendication 1, caractérisé en ce que la réaction entre le ligand et le récepteur est réalisée en mettant en contact un échantillon à analyser et suspecté contenir le ligand et/ou le récepteur, avec un réactif contenant soit le récepteur, soit le ligand, et on applique, à cet échantillon et/ou à ce réactif, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit ligand et/ou dudit récepteur.

10. Procédé d'amplification selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'application, à l'échantillon à analyser, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur est réalisé par exposition de cet échantillon à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou par dilution de cet échantillon dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétiques.

11. Procédé d'amplification selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que l'application, au réactif destiné à réagir avec l'échantillon à analyser, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur est réalisée par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant ce réactif à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou par dilution d'une telle solution ou suspension dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou encore par dissolution ou mise en suspension de ce réactif dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétiques.



12. Procédé d'amplification selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'on applique, à l'échantillon à analyser et au réactif destiné à réagir avec lui, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et ou du récepteur, par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant cet échantillon et ce réactif à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou par dilution d'une telle solution ou suspension dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétique(s).

13. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisé en ce qu'on applique, à l'échantillon à analyser et/ou au réactif destiné à réagir avec lui, à la fois le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du récepteur.

14. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que le solvant ayant été préalablement exposé au(x) signal(aux) électromagnétique(s) est avantageusement de l'eau ou du soluté physiologique.

15. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'acquisition du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre des éléments du couple ligand/récepteur.

16. Procédé d'amplification selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'enregistrement et de restitution d'une information représentative du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre des éléments du couple ligand/récepteur.

17. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de détection et, éventuellement, de mesure des complexes résultant de la réaction entre le ligand et le récepteur.

18. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que le ligand est un antigène ou un haptène,

tandis que le récepteur est un anticorps ou un récepteur membranaire dirigé spécifiquement contre ce ligand.

19. Procédé d'amplification selon la revendication 18, caractérisé en ce que la réaction entre l'antigène et l'anticorps ou l'haptène et l'anticorps est révélée  
5 par agglutination.

20. Procédé de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon analytique, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et 9 à 19.

10 21. Procédé de détection selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, dans des conditions propres à permettre leur réaction,
- préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en  
15 contact, l'application, à l'un et/ou l'autre de ces réactifs, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon analytique, et
- la détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs formés au cours de la réaction entre les deux réactifs.

22. Procédé de détection selon la revendication 21, caractérisé en ce  
20 que les concentrations du ligand et du récepteur sont choisies de manière à être suffisantes pour conduire à l'obtention de complexes ligands-récepteurs détectables en l'absence de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit échantillon, mais inférieures aux concentrations susceptibles d'aboutir à une saturation de la réaction entre ce ligand et ce récepteur.

25 23. Procédé de détection selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de l'échantillon analytique avec un réactif contenant soit le récepteur, si la substance recherchée dans l'échantillon est le ligand, soit le ligand, si la substance recherchée dans l'échantillon est le récepteur, dans des  
30 conditions propres à permettre leur réaction.

– préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application, à cet échantillon et/ou ce réactif, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur, et

– la détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs éventuellement formés.

24. Appareil de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon analytique, caractérisé en ce qu'il met en œuvre un procédé selon la revendication 20 et en ce qu'il comporte :

10 a) des moyens (47) de réception de l'échantillon analytique et d'un réactif contenant soit le récepteur, soit le ligand, permettant leur mise en contact dans des conditions propres à permettre leur réaction ;

b) une source (5, 9, 9', 19) de signal électromagnétique caractéristique de l'activité du ligand et/ou du récepteur ;

15 c) des moyens (51) d'application du signal délivré par ladite source (5, 9, 9', 19) de signal électromagnétique à l'échantillon et/ou le réactif ; et

d) des moyens (53, 55, 57) de détection et/ou de mesure des complexes ligands-récepteurs formés au cours de la réaction entre l'échantillon et le réactif.

20 25. Appareil de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon analytique, caractérisé en ce qu'il met en œuvre un procédé selon la revendication 20 et en ce qu'il comporte :

25 a) des moyens (47) de réception de deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, permettant leur mise en contact dans les conditions propres à permettre leur réaction ;

b) des moyens d'acquisition d'un signal électromagnétique de l'échantillon analytique ;

c) des moyens (51) d'application du signal délivré par lesdits moyens d'acquisition (5, 9, 9', 19) de signal électromagnétique à l'un et ou l'autre des réactifs ; et

d) des moyens (53, 55, 57) de détection et/ou de mesure des  
5 complexes ligands-récepteurs formés en cours de la réaction entre les deux réactifs.

26. Appareil selon la revendication 24 ou la revendication 25, caractérisé en ce que les moyens de détection comportent des moyens de détection optique.

27. Appareil selon l'une quelconque des revendications 24 à 26  
10 caractérisé en ce qu'il comporte une enceinte (13) munie d'un blindage électrique et magnétique entourant lesdits moyens de réception (47).

28. Application d'un procédé de détection de la présence d'une substance dans un échantillon analytique selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 au diagnostic biologique en médecine humaine ou vétérinaire.

15 29. Application d'un procédé de détection de la présence d'une substance dans un échantillon analytique selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 au contrôle bactériologique dans l'industrie pharmaceutique, l'industrie cosmétique, les productions et industries alimentaires.

20 30. Procédé de détection de la présence, dans un signal électromagnétique à tester, d'un signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 15 à 19.

25 31. Procédé de détection selon la revendication 30, caractérisé en ce que le signal électromagnétique est le signal électromagnétique rayonné par une source de rayonnement électromagnétique.

1 / 7

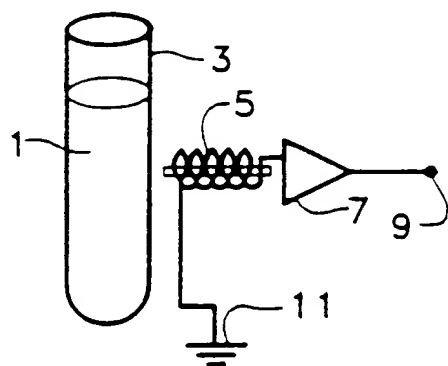


FIG. 1

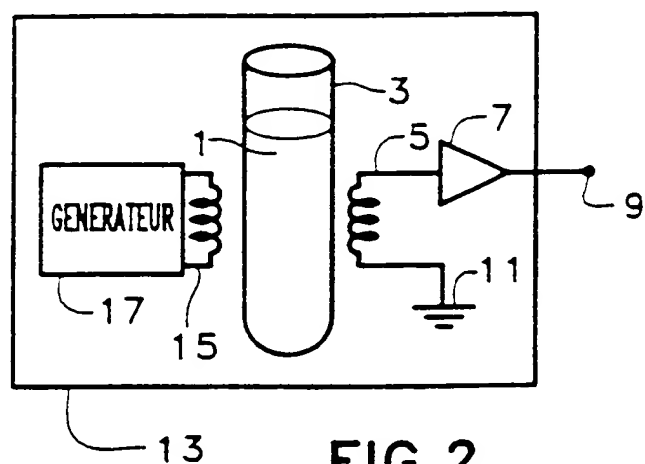


FIG. 2

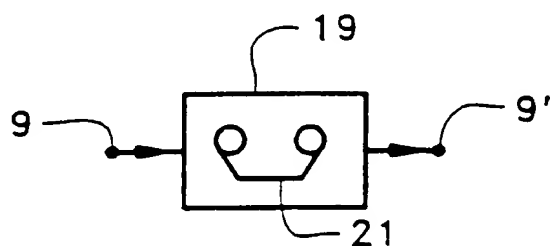


FIG. 3

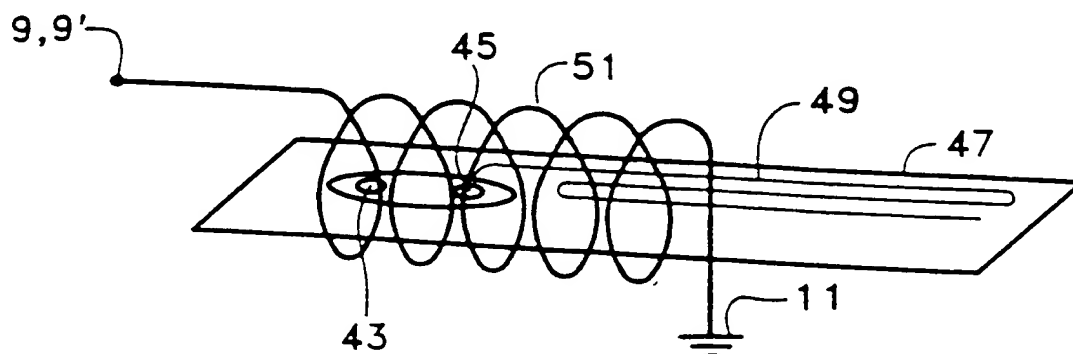


FIG. 5



2 / 7

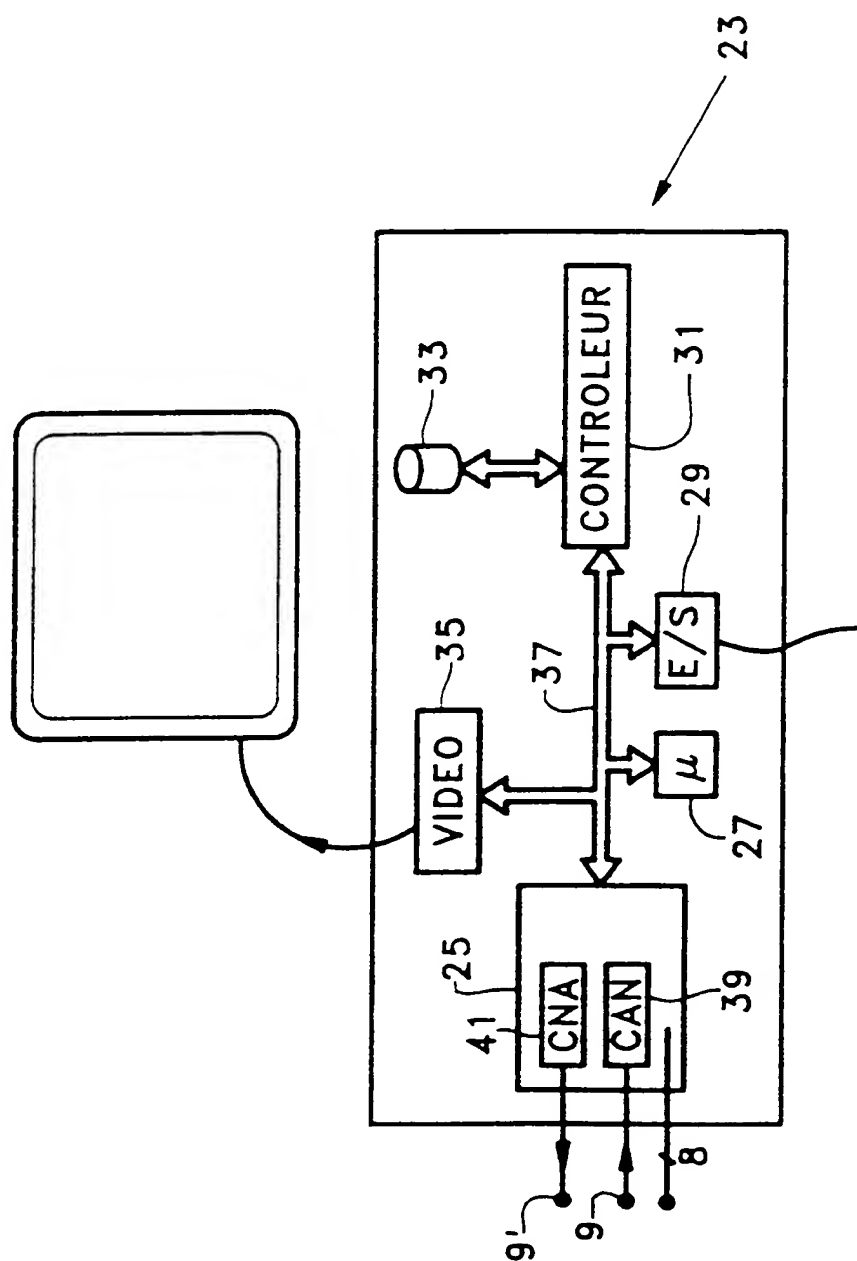


FIG. 4





3 / 7

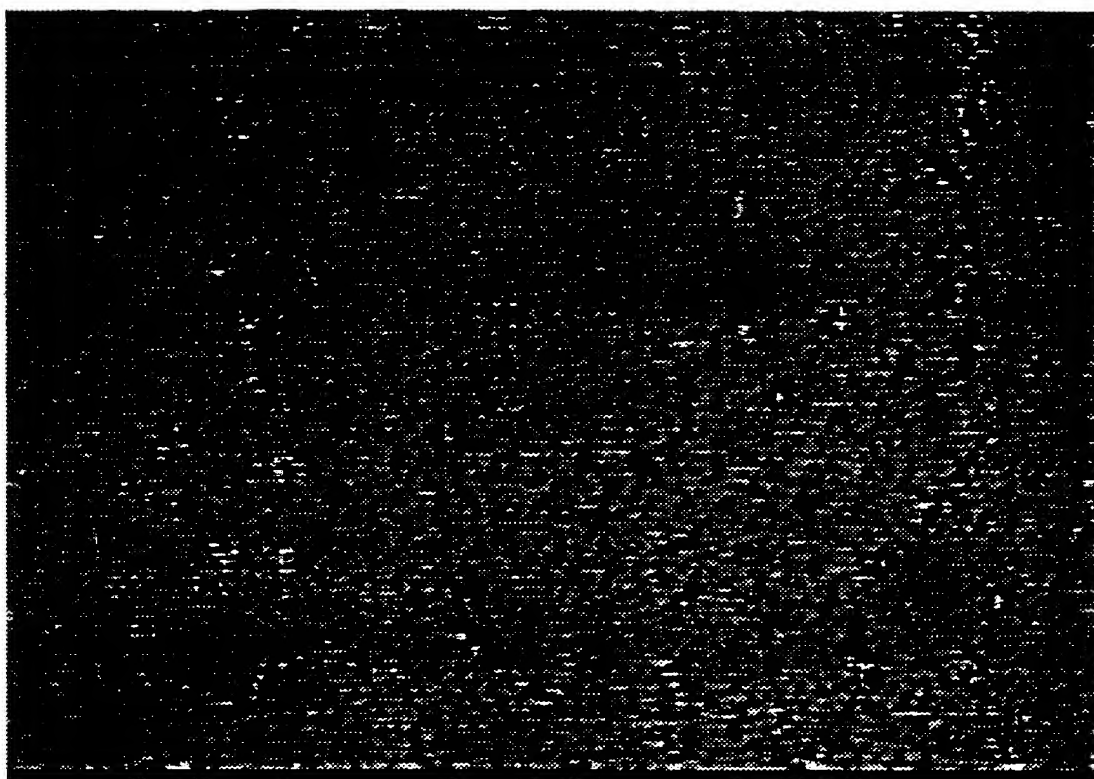


Fig. 6



4 / 7

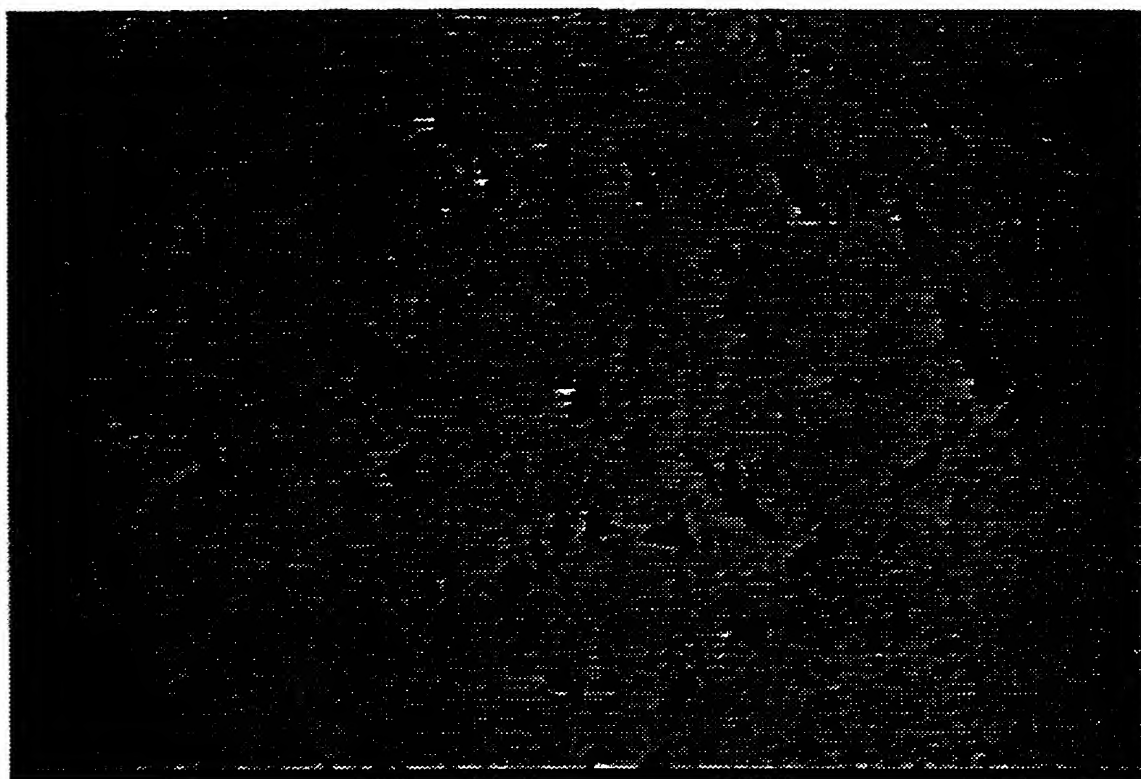


Fig. 7



5 / 7

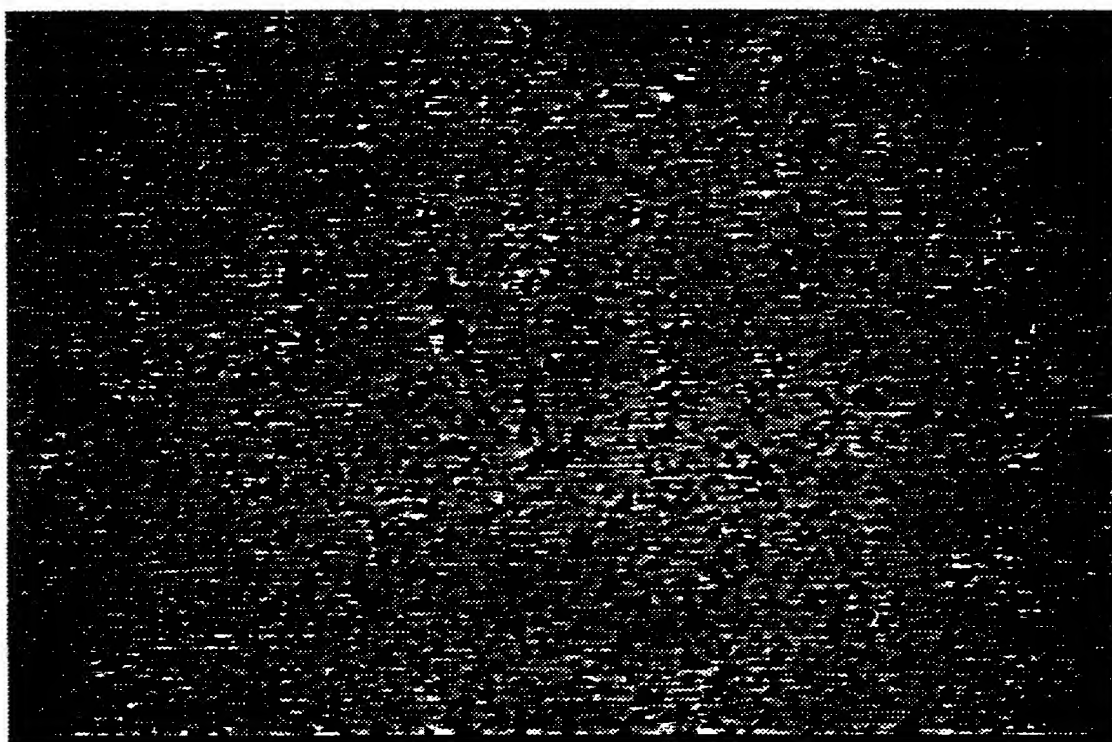


Fig . 8



6 / 7

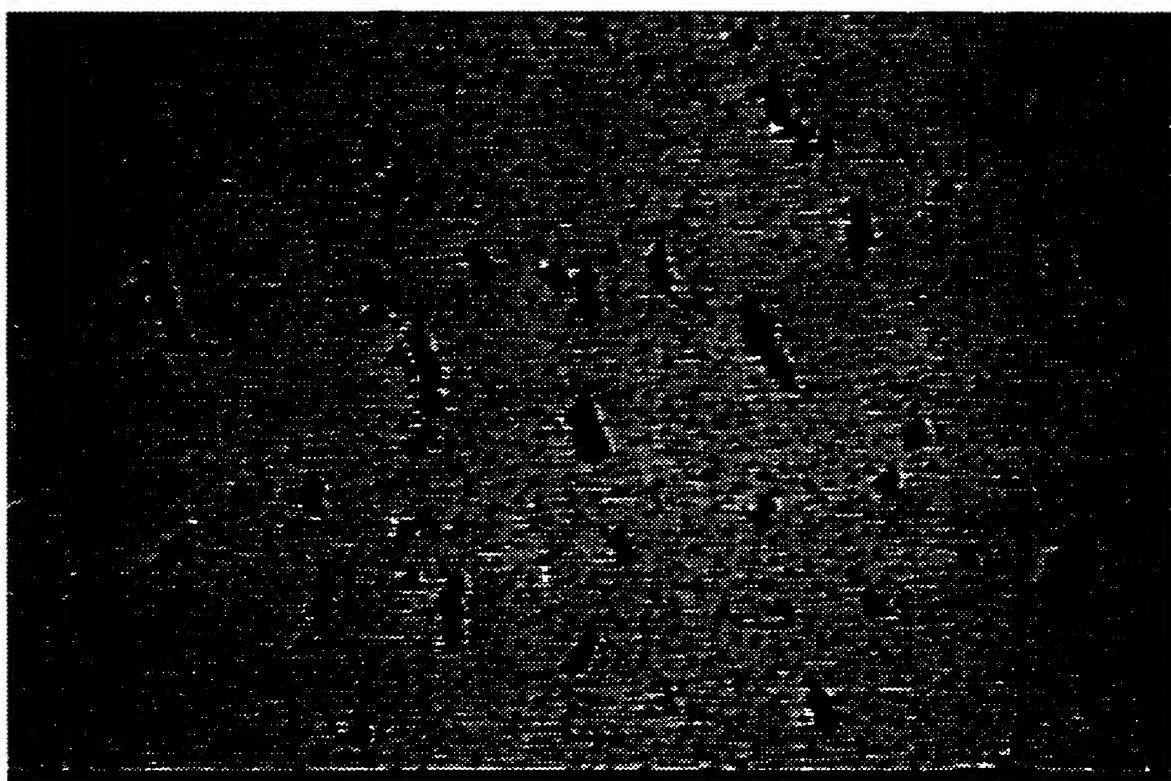


Fig. 9





717

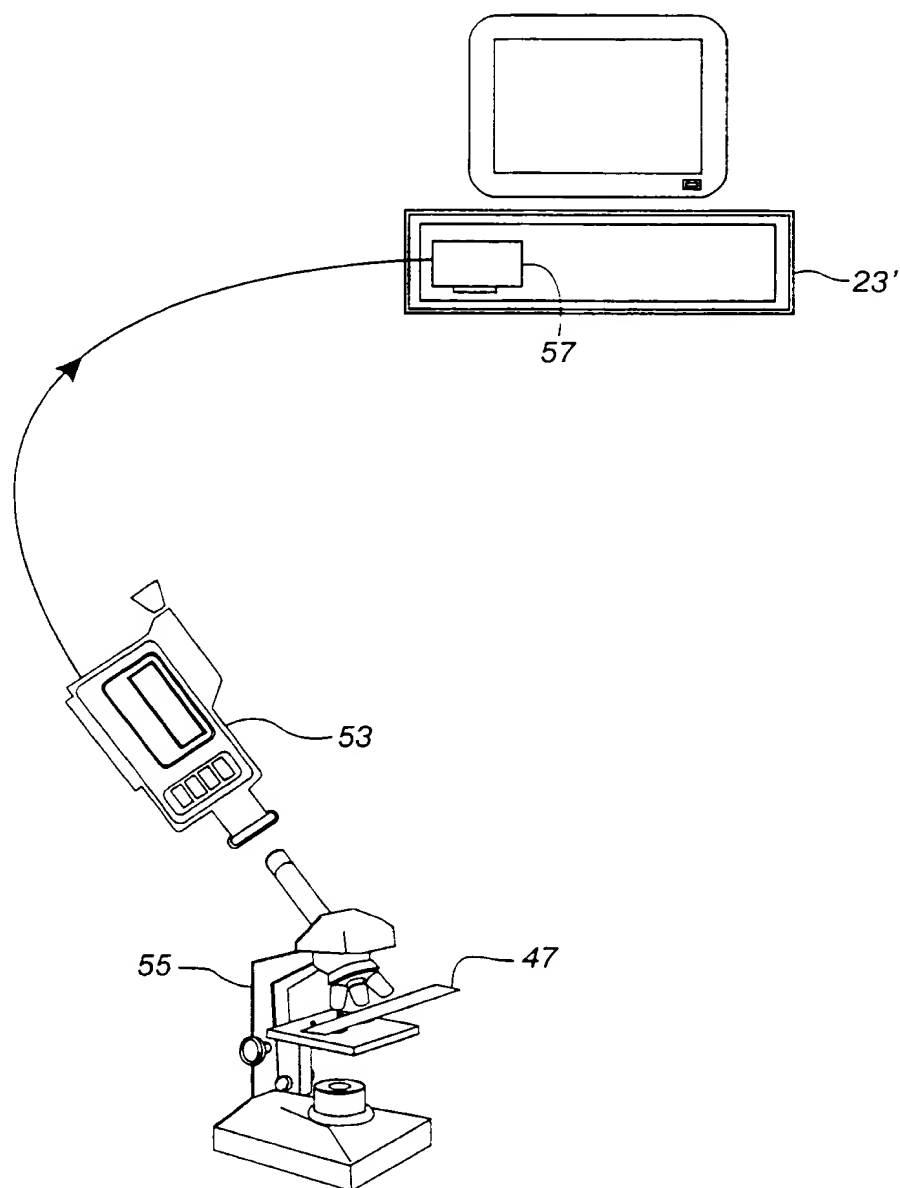


Fig. 10



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :

G01N 33/487, A61K 41/00

A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 94/17406

(43) Date de publication internationale: 4 août 1994 (04.08.94)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00079

(22) Date de dépôt international: 21 janvier 1994 (21.01.94)

(30) Données relatives à la priorité: 93/00612 21 janvier 1993 (21.01.93) FR

(71)(72) Déposant et inventeur: BENVENISTE, Jacques [FR/FR];  
3, rue Laroche, F-75014 Paris (FR).

(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Plasseraud S.A., 3, rue  
Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AU, BG, BR, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, NO,  
NZ, PL, RO, RU, UA, US, brevet européen (AT, BE, CH,  
DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE),  
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.*

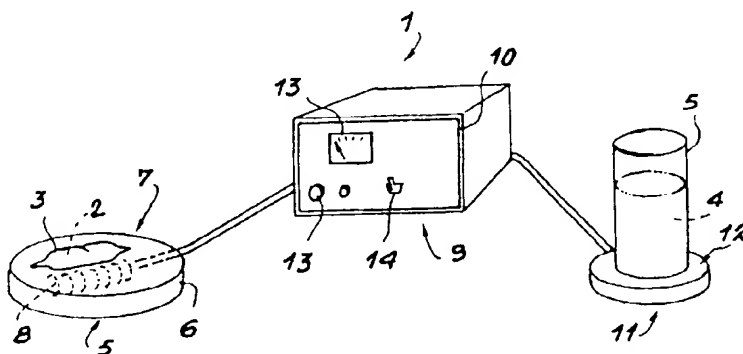
*Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si de telles modifications sont  
reçues.*

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR TRANSMITTING AS A SIGNAL THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF A CARRIER MATERIAL TO ANOTHER CARRIER MATERIAL, AND FOR PROCESSING SAID SIGNAL, AND PRODUCT THEREBY OBTAINED

(54) Titre: PROCÉDE ET DISPOSITIF DE TRANSMISSION SOUS FORME DE SIGNAL DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE D'UNE MATIÈRE PORTEUSE À UNE AUTRE MATIÈRE PORTEUSE, ET DE TRAITEMENT D'UN TEL SIGNAL, ET PRODUIT OBTENU AVEC UN TEL PROCÉDE

(57) Abstract

A method and a device for transmitting and processing a signal representative of the biological activity or behaviour specific to a predetermined substance, from a first carrier material having said biological activity to a second material physically separate from the first and free at first of any physical presence of said predetermined substance, as well as the material resulting from such a method, are disclosed. The method comprises amplifying the electrical or electromagnetic signal transmitted by the first substance and sensed by a sensor, and transmitting, to a transmitter, a signal representative of the biological activity or behaviour of the first material, then sensing in the second material a signal representative of the biological activity specific to said predetermined substance, and transmitted to said second material via high gain amplification means.





(57) Abrégé

Il s'agit d'un procédé et dispositif de transmission sous forme d'un signal caractéristique de la manifestation de l'activité biologique ou du comportement biologique spécifique à une substance déterminée, et du traitement d'un tel signal, à partir d'une première matière porteuse présentant ladite activité biologique à une deuxième matière physiquement séparée de la première matière et initialement exempte de toute présence physique de ladite substance déterminée, et d'une matière obtenue par un tel procédé. Ce procédé comporte l'amplification du signal électrique ou électromagnétique émis par la première substance, et capté par un capteur, et la transmission à un émetteur, d'un signal caractéristique de la manifestation de l'activité biologique ou du comportement biologique présentée par la première matière, puis la détection dans la seconde matière d'un signal caractéristique de la manifestation de l'activité biologique spécifique à ladite substance déterminée et transmis à cette deuxième matière par l'intermédiaire des moyens d'amplification à haut gain.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				



PROCEDE ET DISPOSITIF DE TRANSMISSION SOUS FORME DE SIGNAL DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE D'UNE MATIERE PORTEUSE A UNE AUTRE MATIERE PORTEUSE, ET DE TRAITEMENT D'UN TEL SIGNAL, ET PRODUIT OBTENU AVEC UN TEL PROCEDE.

La présente invention concerne un procédé et un dispositif de transmission sous forme d'un signal de l'activité biologique ou du comportement biologique spécifique à une substance déterminée, à partir d'une première matière porteuse présentant ladite activité biologique, à une deuxième matière porteuse initialement exempte de toute présence physique de ladite substance déterminée. Elle concerne également un produit obtenu avec un tel procédé.

Par "activité biologique" on entend toute activité susceptible d'être exercée par une substance biologique à l'égard d'une autre substance plus commodément appelée cible.

La cible peut être simple ou complexe, comme par exemple une molécule, un organe, un être vivant, en particulier lorsque l'activité biologique concernée n'implique pas la réalisation d'une liaison chimique stable entre la substance et la cible.

L'activité biologique spécifique peut être celle d'une substance naturelle ou celle d'une substance artificielle créée par l'homme.

L'expression "substance" telle qu'elle est utilisée ici pour des raisons de commodité de langage, ne doit pas être considérée comme ne s'appliquant qu'à une molécule chimique pure ou individualisée. Elle doit également et notamment être entendue comme englobant tout réactif complexe susceptible de manifester une activité biologique





qui serait propre à l'ensemble des éléments dont le réactif pourrait être constitué.

Comme indiqué d'ores et déjà ci-dessus, et en résumé, il résulte donc, de ce qui précède que l'expression "cible" doit quant à elle également être prise dans son sens le plus large, pour être utilisable aussi bien et, selon le cas, (à titre d'exemples) pour une molécule individualisée, par exemple un substrat spécifique d'une enzyme, lorsque celle-ci constitue la "substance" susdite, et pour un organe d'un être vivant lorsque c'est à son égard qu'est testée "l'activité biologique" de la "substance" à l'étude.

L'invention trouve une application particulièrement importante bien que non exclusive dans le domaine de la fabrication de médicaments homéopathiques présentant une activité biologique correspondant à un ou plusieurs principes actifs.

L'invention met à profit une propriété extraordinaire de la matière qui a été mise en lumière par un certain nombre d'expériences dont les résultats sont décrits plus loin, à savoir qu'il est possible de transmettre par des moyens électroniques ou électromagnétiques ne mettant en jeu ou pratiquement en jeu qu'un circuit électronique d'amplification à haut gain, l'expression d'une activité biologique spécifique d'une matière la présentant à une autre matière ne présentant pas initialement ladite activité.

La base physique du procédé selon l'invention est encore inconnue. Elle s'explique peut-être par l'hypothèse suivante : la manifestation de toute activité biologique d'origine moléculaire mettrait en oeuvre à tout le moins partiellement, une activité de type électrique ou électromagnétique. Des observations comme l'inhibition de l'activité biologique par un champ magnétique confortent cette



hypothèse, [L.Hadji, B. Arnoux, J.Benveniste (1991) Effect of dilute histamine on coronary flow of guinea-pig isolated heart. Inhibition by a magnetic field, *Faseb J.* 5:A1583. Voir aussi : J.C. Weaver, R.D. Astumian (1990) The response of living cells to very weak electric fields: the thermal noise limit. *Science* 247:459462 ; R. Pool (1990) Electromagnetic fields: the biological evidence. *Science* 249:1096-1098 ; Smith C.W., Best S. (1989) The Electromagnetic Man. J.M. Dent and Sons Ltd., Avon, U.K.].

On connaît également un document (FR 2.634.381) décrivant un procédé pour la fabrication de médicaments homéopathiques en une seule opération quelque soit la dilution choisie.

Aucun exemple de mise en oeuvre du procédé montrant un résultat reproductible ou vérifiable par l'homme du métier n'y est cependant décrit ou indiqué. Ce document fait par ailleurs état de la nécessité de prévoir nécessairement de moyens générateurs hautes fréquences agencés pour superposer un signal alternatif haute fréquence aux signaux qui seraient transmis par l'appareil décrit en référence au procédé.

Une telle disposition est exclue par la présente invention, qui vise par ailleurs à fournir un procédé simple à mettre en oeuvre et de portée plus générale.

Dans ce but l'invention propose notamment un procédé de transmission sous forme d'un signal caractéristique de la manifestation de l'activité biologique ou du comportement biologique spécifique à une substance déterminée, à partir d'une première matière porteuse présentant ladite activité biologique à une seconde matière physiquement séparée de la première matière et initialement exempte de toute présence physique de ladite



substance déterminée, ce procédé comportant à la fois l'exposition respectivement de la première matière porteuse, présentant l'activité biologique, à un capteur de signaux électriques ou électromagnétiques, et l'exposition de la seconde matière à un émetteur de signaux électriques ou électromagnétiques, relié au capteur par l'intermédiaire d'un circuit de transmission et d'amplification caractérisé en ce que on amplifie avec un amplificateur à haut gain le signal électrique ou électromagnétique capté par le capteur, sans générer électriquement dans le circuit d'ondes électromagnétiques additionnelles, pendant un temps suffisant pour permettre la transmission à l'émetteur d'un signal caractéristique de la manifestation de l'activité biologique ou du comportement biologique présentée par la première matière, et pour permettre la détection dans la seconde matière d'un signal transmis à celle-ci par l'intermédiaire des moyens d'amplification à haut gain, ce signal étant révélabile dans un protocole expérimental identique ou semblable à celui que l'on mettrait en oeuvre pour rendre compte de la présence de ladite substance déterminée dans un milieu qui la contiendrait.

En d'autres termes, la détection de la manifestation caractéristique de l'activité ou du comportement biologique spécifique de la substance déterminée est révélabile par l'action que le signal transmis peut exercer sur un substrat (organisme ou réactifs) lors de la mise en oeuvre d'un protocole expérimental identique ou semblable à celui permettant normalement la mise en évidence de la présence dans la première matière porteuse de ladite substance déterminée, grâce à l'action exercée par cette dernière sur le même substrat.



Les moyens de transmission et d'amplification à haut gain comportent un support ou milieu support propre à véhiculer un flux cohérent d'informations à caractères électromagnétiques ou électriques. Ce support comprend par exemple un câble conducteur de l'électricité ou des moyens permettant l'exploitation d'un faisceau lumineux porteur de lumière cohérente.

Par "moyen d' amplification à haut gain" on entend des moyens caractérisés par un coefficient d' amplification d'un signal électrique ou électromagnétique important, notamment supérieur à 1000 et de préférence supérieur à 10.000.

Par exemple la tension est amplifiée de 100 microvolts à 6 Volts et, simultanément l'intensité de 100nA à 150 mA.

Il est important de noter que le circuit entre capteurs et émetteur est agencé pour ne pas modifier la structure du signal transmis, même s'il l'amplifie.

Dans un mode de réalisation avantageux, on filtre les hautes fréquences, par exemple et notamment celles supérieures à 10 kHz pendant la transmission, de sorte qu'aucune onde alternative de haute fréquence, par exemple supérieure à 10 kHz ne transite via le circuit jusqu'à l'émetteur auquel est exposée la seconde matière.

Les signaux transmis sont donc limités aux basses fréquences.

A titre indicatif, on mentionnera qu'avec de tels dispositifs de transmission et d'amplification à haut gain, les temps d'exposition plus haut sont au moins de l'ordre de 10 mn, à de préférence de l'ordre de 15 minutes.

Egalement avantageusement la première et/ou la seconde matière porteuse sont, ou contiennent, des solvants dits "protoniques",





c'est-à-dire capables de libérer et/ou de capter des protons, comme par exemple l'eau, l'éthanol ou tout produit présentant un proton labile lié à un atome électro-négatif, de formule du type  $R - X - H$ .

Avantageusement, la première matière porteuse et/ou la seconde matière porteuse sont plus spécifiquement de l'eau, ou des produits aqueux. Elle peut (ou elles peuvent) être constituées par toutes matières imprégnables par de l'eau, même si celle-ci n'est présente qu'en faibles proportions. Dans le cas de l'eau, celle-ci est avantageusement constituée par de l'eau distillée, qui a été préalablement chauffée à une température supérieure à de l'ordre de 70° C pendant un temps supérieur à de l'ordre de 20 minutes.

Avantageusement seuls des signaux électromagnétiques sont captés, amplifiés et transmis entre le capteur et l'émetteur.

Dans un mode de réalisation avantageux le procédé selon l'invention est appliqué au traitement des eaux, par exemple à la dépollution des eaux usées ou contaminées biologiquement.

Encore avantageusement la seconde matière est une matière vivante, par exemple un organe non humain.

Avantageusement le signal transmis est stocké de façon intermédiaire (avant d'être transmis à la seconde matière) sur un support de stockage électro-magnétique de type connu en lui même, comme une bande magnétique, ou après traitement par un convertisseur analogique/numérique sur un support de stockage numérique tel qu'un disque optique, une mémoire informatique etc.

Egalement avantageusement le signal transmis est traité par des méthodes de traitement numérique ou analogique connues en elles-même, afin d'être modifié et correspondre ainsi à l'activité



biologique d'une substance présentant un principe actif modifié, optimisé, amplifié, purifié ou sans effets secondaires.

On peut ainsi et notamment influencer (augmenter, s'opposer, voir supprimer) une activité biologique déterminée.

Pour optimiser ou modifier de tels signaux en vue d'obtenir un résultat différent de celui obtenu par le signal correspondant au principe actif initial, on procédera par exemple en testant le principe actif modifié grâce à la mise en oeuvre de différents protocoles expérimentaux connus ou aisés à élaborer pour l'homme du métier et qu'il a à sa disposition pour rendre compte de l'activité d'un principe actif déterminé ou amélioré.

Avantageusement le signal transmis correspond à celui émis par plusieurs substances présentes dans la première matière et il est traité par des méthodes de traitement numérique ou analogique connues en elles-mêmes, pour analyser et mesurer une desdites substances parmi les autres, comme par exemple le taux sanguin de glucose ou d'alcool.

Dans un mode de réalisation avantageux, la substance déterminée est présente en dose homéopathique dans la première matière porteuse.

La dose homéopathique utilisée est alors avantageusement optimisée de façon à permettre une manifestation maximum de l'effet biologique recherché, et ce de façon connue en elle-même, à partir de nombreux traités écrits et publiés en l'espèce, comme par exemple "l'homéopathie pratique" du docteur C.BINET paru aux éditions d'ANGLES (1979).

Dans un mode de réalisation avantageux la substance déterminée est présente en dose homéopathique dans la première matière porteuse,



avec des dilutions supérieures à la limite indiquée par le nombre d'Avogadro.

Dans un mode avantageux de réalisation, la dilution est une dilution de l'ordre de  $- \log_{10} M$  (théorique).

Avantageusement la seconde matière est constituée par des granules homéopathiques.

Les granules homéopathiques sont souvent à base de lactose imprégné de molécules d'eau.

L'invention concerne également une matière en un volume fini et porteuse d'une information caractéristique du comportement biologique spécifique à une substance déterminée, mais en l'absence totale de cette substance déterminée dans ladite matière, cette information étant à caractère électrique ou électromagnétique en raison de sa capacité à être transmissible par des moyens électriques ou électromagnétiques, cette manifestation étant normalement révélabile par l'action exercée par cette matière en volume fini à l'égard d'un substrat spécifique à la substance déterminée dans un protocole expérimental identique ou semblable à celui que l'on mettrait en oeuvre pour rendre compte de la présence de ladite substance déterminée dans un milieu qui la contiendrait.

Un procédé particulièrement avantageux pour la production d'une telle matière porteuse est un procédé comportant la mise en relation électrique ou électromagnétique de la même matière, cependant non initialement porteuse de la susdite information et exempte de toute présence physique de ladite substance déterminée, avec un milieu contenant cette dernière, par l'intermédiaire de moyens de transmission de signaux électromagnétiques ou électriques comprenant un appareil muni de moyens récepteurs, de moyens amplificateurs à haut gain et



des moyens de filtration des hautes fréquences entre les moyens capteurs au-dessus de 10 kHz.

L'invention propose également un dispositif mettant en oeuvre le procédé selon l'invention, comprenant des moyens capteurs de signaux électriques ou électromagnétiques émis par une première matière et caractéristiques d'une manifestation spécifique d'une activité biologique d'une substance déterminée contenue dans cette première matière, des moyens amplificateurs à haut gain desdits signaux et des moyens émetteurs propres à transmettre des signaux également caractéristiques de l'activité biologique à une deuxième matière autrement dépourvu de tout contact avec la première.

Dans des modes particuliers de réalisation, on a de plus recours à l'une et/ou à l'autre des dispositions suivantes :

- les moyens amplificateurs comportent un circuit électronique d'amplification à haut gain, sous forme d'éléments discrets ou du type semi-conducteur ;
- un filtre coupe haut est connecté auxdits moyens capteurs agencé pour filtrer toutes fréquences dans le circuit au-dessus de de l'ordre de 10 kHz ;
- le filtre coupe haut filtre toutes fréquences au-dessus de l'ordre de 5 kHz, avantageusement au-dessus de 1 kHz ou moins ;
- le circuit électronique d'amplification comprend un transistor de sortie monté en émetteur commun ;
- le capteur et l'émetteur comportent des bobines électromagnétiques ;
- l'alimentation de l'appareil se fait par batterie, ce qui permet d'éviter les perturbations possibles du secteur.

Mais une alimentation à partir du réseau alternatif 220 Volts convertie en faible tension continue, par exemple 9 Volts, est également tout à fait utilisable ;





- le dispositif comprend de plus des moyens support de stockage électro-magnétique des signaux transmis, de type connu en eux même, comme par exemple une bande magnétique;
- le dispositif comporte de plus des moyens convertisseurs analogique/numérique des signaux transmis et des moyens de stockage sur un support de stockage de données numériques desdits signaux, comme par exemple un disque optique, une mémoire informatique etc ;
- le dispositif comprend des moyens de traitement numérique ou analogique du signal transmis, pour modifier le dit signal pour le faire correspondre à celui d'une substance présentant un principe actif modifié, optimisé, amplifié, purifié ou sans effets secondaires ;
- le dispositif comprend des moyens de traitement numérique ou analogique agencés pour analyser et mesurer les signaux transmis correspondant à une substance parmi d'autres, comme par exemple le taux de glucose dans le sang ou le taux d'alcool ;
- la seconde bobine est agencée pour émettre vers une matière vivante, tel qu'un organe non humain.

La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui suit d'un mode de réalisation donné à titre d'exemple non limitatif, et au vu des exemples et résultats fournis ci-après de façon non limitative.

La description se réfère également aux dessins qui l'accompagnent, dans lesquels :

- La figure 1 est un schéma du dispositif selon un mode de réalisation de l'invention.
- La figure 2 est un schéma électrique du dispositif de transmission de la figure 1.

La figure 1 montre un dispositif 1 de transmission de l'activité biologique spécifique à une substance déterminée, par exemple de l'histamine



ou de l'ovalbumine, d'une première matière porteuse 2, par exemple constituée par de l'eau distillée placée dans une ampoule de préférence en verre 3 de 1 à 10 ml, à une deuxième matière 4 également constituée par de l'eau distillée et placée dans une ampoule de 1 à 10 ml ou un récipient 5 par exemple de 500 ml, voire plus, également et de préférence en verre.

La matière 2 peut comporter en son sein la présence physique de la substance déterminée, en quantité ou non homéopathique, ou peut simplement comporter les informations caractéristiques de l'activité ou du comportement biologique spécifique à la substance déterminée.

La présence physique peut par exemple être révélée par une méthode du type spectrométrie ou spectrofluorométrie.

Les informations caractéristiques d'une manifestation elle-même caractéristique du comportement biologique spécifique à une substance déterminée peut, quand à elle, être normalement révélabile à l'occasion de l'action qu'elle peut exercer sur un milieu contenant cette substance déterminée à l'égard d'une cible (organisme ou réactifs) mis en oeuvre dans un protocole expérimental apte à rendre compte de la présence dans ce milieu de ladite substance déterminée.

La matière 4 est initialement exempte en son sein de toute présence physique de ladite substance déterminée, et n'est pas initialement porteuse d'informations caractéristiques du comportement biologique spécifique à la substance déterminée.

Le dispositif 1 comprend un capteur électromagnétique 5 comportant un boîtier 6, muni d'un plateau 7 sur lequel l'ampoule 3 est déposée.

Dans le mode de réalisation plus particulièrement décrit ici, le plateau est par



exemple constitué en matière plastique transparente aux ondes électromagnétiques, de faible épaisseur (par exemple 2 millimètres).

A l'intérieur du boîtier 6 se trouve le capteur électromagnétique proprement dit, par exemple constitué par une bobine réceptrice 8 comme on le verra en référence à la figure 2.

Le capteur 5 est relié, par câble conducteur électrique, à un circuit 9 amplificateur à haut gain placé dans un boîtier 10.

La sortie du circuit 9 est connectée, également par câble conducteur électrique, à un capteur émetteur 11, de configuration similaire au capteur 5 mais agencé pour l'émission, et sur le plateau 12 duquel est placé l'ampoule ou le récipient 5 de rétention de la deuxième matière 4.

Le circuit 9 comprend des moyens 13 de réglage de la puissance (potentiomètre, cadran, etc) et de mise sous tension 14 (interrupteur) du dispositif connus en eux-mêmes.

On a représenté plus précisément sur la figure 2 le circuit électronique 9 du dispositif 1 selon le mode de réalisation de l'invention plus particulièrement décrit ici.

Le circuit 9 est connecté d'un côté à la bobine électromagnétique 8 à haute impédance (réceptrice) (par exemple une bobine constituée d'environ 600 spires de fil émaillé de 5/100 ) appartenant au capteur 5, et de l'autre côté à la bobine électromagnétique 15 à haute impédance (émettrice) (par exemple une bobine constituée de 100 spires de fil émaillé de 20/100) appartenant au capteur 11.

Le circuit 9 comprend un filtre coupe haut 16 (par exemple de 10kHz) connecté à la bobine 8 et un préamplificateur 17 comportant un transistor amplificateur 18.



Le préamplificateur 17 est connecté en sortie à l'amplificateur opérationnel 19 qui peut être connecté directement à la bobine émettrice 15, ou comme représenté sur la figure 2, via un transistor de sortie 20 monté en émetteur commun pour engendrer un courant de sortie de plus forte intensité.

Une telle modification permet de traiter des volumes de liquides plus importants dans le même temps, la tension alternative de sortie étant par ailleurs et par exemple de 4 à 5 Volts crête à crête.

Sinon la disposition ci-dessus garantit à la sortie un signal équivalent à une tension de 3 ou 4 V et un courant d'au moins 20 mA.

Dans une variante avantageuse l'amplificateur est à gain variable par exemple de  $< 1\text{mV}$  à  $> 3/4\text{ V}$  et de  $< 10\text{ microampères}$  à  $> 20\text{ mA}$ .

L'alimentation du circuit permettant la polarisation des transistors se fait avantageusement exclusivement par des batteries (non représentées), ce qui permet d'éviter les modifications incontrôlées de la structure du signal dues à des perturbations imprévisibles du réseau d'alimentation 50 Hz (secteur), en cas d'utilisation d'un transformateur.

On va maintenant faire référence, à titre illustratif, à deux exemples spécifiques de transfert.

Dans le premier cas (exemple n°1), il s'agissait d'un transfert à partir d'eau distillée, des principes actifs de l'ovalbumine (Ova) ou de l'endotoxine de E.Coli (Endo) vers une seconde matière également constituée d'eau distillée, et dans le deuxième cas (exemple n°2) d'un transfert toujours entre deux matières constituées d'eau distillée, des principes de l'endotoxine de E.Coli (Endo) ou de l'histamine (Hista).

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200



Un tableau récapitulatif de plusieurs expériences effectuées par l'inventeur à ce jour, qui ont ainsi pu valider le procédé et le dispositif de l'invention, est également présenté.

La méthode de détection de l'activité biologique utilisée dans les expériences effectuées, dont celles correspondant aux deux exemples ci-après, est la suivante.

Des coeurs de cobayes mâles d'Hartley d'environ 400 g sont montés sur un appareil connus sous la dénomination ANDERSON pour perfusion de coeur et perfusés à 37°C avec une solution tampon Krebs-Henseleit (KHB en initiales anglosaxonnes pour Krebs-Henseleit Buffer) (1mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) avec un pH de l'ordre de 7,4. La solution est aérée en permanence avec un mélange  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  à 95,5%.

Le débit coronaire est contrôlé en permanence par exemple à l'aide d'un dispositif de pesage automatique connu en lui-même, connecté à des moyens informatiques de traitement et de restitution des débits mesurés, sous forme graphique.

Les contractions systoliques maximales et minimales, le rythme cardiaque et les valeurs de  $dp/dt$  (vitesse de la contraction musculaire) sont mesurées et enregistrées en permanence via un transducteur, par exemple un transducteur connu sous la référence ELI-S045-35 de la société **EMKA Technologies** : 53 bld du Général Martial Vallin - 75015 Paris (France).

Les principes actifs (histamine, ovalbumine ou endotoxine d'E.Coli) qui ont fait l'objet d'un transfert, ont été dilués à partir de concentration d'1mM avec de l'eau distillée.

Entre chaque dilution, les solutions étaient violemment agitées dans un vortex pendant 15 s.



Les solutions sont injectées à la base de l'aorte avec une seringue électrique (6 ml ; 1 ml/mn).

EXEMPLE N°1 :

Le transfert d'ovalbumine (Ova), d'endotoxine de E.Coli (Endo) et, à titre de contrôle, d'eau distillée, en ampoules scellées de 2 ml, a été effectué vers des ampoules-filles scellées d'eau distillée de 2 ml.

La concentration en principe actif était dans les ampoules "émettrices" de  $1 \times 10^{-8}$  Moles par litre.

Les ampoules-filles ont ensuite été diluées au 1/1000 et 20 ml des dilutions ont été répartis en tubes de 50 ml.

Les tubes ont été testés à l'aveugle (dans l'ordre, de 1 à 12) les 11 et 12 juillet 1992 sur deux coeurs isolés de cobayes préimmunisés à l'ovalbumine.

Les résultats sont les suivants :

Tubes N°	Principe actif transféré (ampoule-mère)	% variation du flux coronaire		Principe actif détecté dans le tube récepteur (ampoule-fille)
		Coeur A	Coeur B	
1	Endo	50	17	+
2	Endo	55	21	+
3	Ova	75	93	+
4	H2OTr*	0	0	-
5	Ova	-50	-53	+
6	H2O**	0	0	-
7	H2OTr	0	0	-
8	H2O	0	0	-
9	H2O	0	0	-
10	H2OTr	0	0	-
11	H2O	11	10	- ***
12	Ova	-37	-42	+

\* eau ayant reçu une information eau

\*\* eau d'origine

\*\*\* résultat légèrement variant mais néanmoins acceptable. Il s'explique probablement par une



contamination bactérienne du tube, donnant une réaction de type endotoxine.

Les effets des 5 tubes actifs (eau ayant reçu une information Ova ou Endo) et l'absence d'effet des 7 contrôles (eau d'origine ou ayant reçu une information eau) sont nets et reproductibles.

On retrouve ces différences sur les effets mécaniques (non montrés ici).

Cette expérience illustre la transmission d'activités biologiques à de l'eau par un circuit électronique ou électromagnétique selon l'invention.

#### EXEMPLE N°2 :

Les tubes ont été testés le 23 septembre 1992.

Les conditions opératoires sont identiques à celles de l'exemple 1.

Les résultats sont les suivants :

Tubes N°	Principe actif transféré (ampoule-mère)	% variation du flux coronaire	Principe actif détecté dans le tube récepteur (ampoule-fille)
1	H <sub>2</sub> OTR	0	-
2	H <sub>2</sub> OTR chauffée	0	-
3	HistaTR	-10	+
4	OvaTR	-94	+

#### TABLEAU RECAPITULATIF

Le tableau suivant donne les effets sur le flux coronaire en % de variation du débit (en + ou en -) sur des coeurs de cobayes préalablement immunisés à l'ovalbumine (en présence d'Alum comme adjuvant) fin octobre 1992.



	Nombre d'expériences	Moyenne %	Erreur type
C1	24	5,2	0,8
C2	63	8,8	$\pm 1,3$
Hista	52	33,6	$\pm 3,9$
Ova	57	34,4	$\pm 4,2$
Endo	39	39,9	$\pm 5,9$

avec :

- C<sub>1</sub> : eau non transmise  
 C<sub>2</sub> : eau transmise, c'est-à-dire qui a reçu une information neutre (bruit de fond du dispositif)  
 Hist : eau avec histamine transmise, c'est-à-dire qui a reçu une information "Histamine"  
 Ova : eau avec ovalbumine transmise, c'est-à-dire qui a reçu une information "Ovalbumine"  
 Endo : eau avec endotoxine transmise, c'est-à-dire qui a reçu une information "Endotoxine".

Comme on peut le constater les flux coronaires varient de façon significative et systématique lors du transfert d'informations correspondant à l'histamine, l'ovalbumine ou l'endotoxine, alors qu'en présence d'eau (transmise ou non), de faibles variations ou sensiblement aucune variation sont observées, ce qui illustre la présente invention.

L'utilisation de seconde matière dans laquelle se manifeste l'activité transmise peut se faire par exemple par voie orale, par injection, par imprégnation voire même par contact entre la peau de l'individu à traiter et un récipient contenant ladite seconde matière.

Comme il va de soi, et comme il résulte d'ailleurs de ce qui précède, la présente invention n'est pas limitée aux modes de réalisation de l'invention plus

The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It then proceeds to a literature review, followed by a description of the methodology used in the study. The results of the study are then presented, followed by a discussion of the findings and their implications. The paper concludes with a summary of the main points and a list of references.

The study was conducted in a laboratory setting, and the results were compared with those of previous studies. The findings of the study are consistent with those of previous studies, and they provide new insights into the topic. The implications of the study are discussed, and it is concluded that the study has contributed to the understanding of the topic.

The study was conducted in a laboratory setting, and the results were compared with those of previous studies. The findings of the study are consistent with those of previous studies, and they provide new insights into the topic. The implications of the study are discussed, and it is concluded that the study has contributed to the understanding of the topic.



particulièrement décrit. Elle en concerne au contraire toutes les variantes et notamment celles où :

- les matières porteuses ne sont pas de l'eau pure, mais des mélanges aqueux, ou des matières pâteuses ou solides,
- les capteurs ne sont pas de type électromagnétique mais du type électrique, c'est-à-dire qu'ils sont agencés pour détecter une différence de potentiel. Il peut alors s'agir de plaques métalliques reliées entre elles via un amplificateur à haut gain, les première et deuxième matières ou leurs récipients étant notamment placées à contact avec les capteurs,
- les principes actifs sont différents de ceux plus particulièrement testés. Tous types de molécules biologiques susceptibles d'être contenues dans tous types de substances naturelles ou artificielles agissant sur les êtres vivants, espèces animale ou végétale, sont en fait concernés. Il peut s'agir par exemple des substances présentes dans le sang ou tout autre liquide organe ou tissu biologique des animaux ou des hommes in vitro, ex vivo, in vivo.

La révélation de la présence d'informations correspondant à un principe actif pourra alors se faire différemment, de façon connue en elle-même par un homme du métier pour le principe actif concerné.



REVENDEICATIONS

1. Procédé de transmission sous forme d'un signal caractéristique de la manifestation de l'activité biologique ou du comportement biologique spécifique à une substance déterminée, à partir d'une première matière porteuse (2) présentant ladite activité biologique à une seconde matière (4) physiquement séparée de la première matière et initialement exempte de toute présence physique de ladite substance déterminée, ce procédé comportant à la fois l'exposition respectivement de la première matière porteuse, présentant l'activité biologique, à un capteur (5) de signaux électriques ou électromagnétiques, et l'exposition de la seconde matière à un émetteur (11) de signaux électriques ou électromagnétiques, relié au capteur par l'intermédiaire d'un circuit (9) de transmission et d'amplification, caractérisé en ce que on amplifie avec un amplificateur à haut gain le signal électrique ou électromagnétique capté par le capteur (5) sans générer électriquement dans le circuit d'ondes électromagnétiques additionnelles, pendant un temps suffisant pour permettre la transmission à l'émetteur (11) d'un signal caractéristique de la manifestation de l'activité biologique ou du comportement biologique présentée par la première matière (2), et la détection dans la seconde matière (4) d'un signal, transmis à celle-ci par l'intermédiaire des moyens d'amplification à haut gain, ce signal étant révélabile dans un protocole expérimental identique ou semblable à celui que l'on mettrait en oeuvre pour rendre compte de la présence de ladite substance déterminée dans un milieu qui la contiendrait.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on filtre les fréquences supérieures à 10 kHz pendant la transmission.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le signal est transmis pendant un temps supérieur à de l'ordre de 10 mn.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la transmission s'effectue pendant un temps égal à de l'ordre de 15 mn.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la première et/ou la seconde matière porteuse sont, ou contiennent, des solvants dits "protoniques", c'est-à-dire capables de libérer et/ou de capter des protons, comme l'eau, l'éthanol ou tout produit présentant un proton labile lié à un atome électro-négatif de formule du type  $R - X - H$ .

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la première matière porteuse et/ou la seconde matière porteuse sont de l'eau ou un produit aqueux.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la première matière porteuse et/ou la seconde matière porteuse est constituée par de l'eau distillée qui a été préalablement chauffée à une température supérieure à de l'ordre de 70°C pendant un temps supérieur à de l'ordre de 20 minutes.

8. Application du procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes au traitement des eaux usées ou à dépolluer.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la seconde matière est une matière vivante, tel qu'un organe non humain.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les signaux captés, amplifiés et transmis entre capteur et émetteur sont électromagnétiques.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la transmission s'effectue par l'intermédiaire d'un support propre à véhiculer un flux cohérent d'informations à



caractères électromagnétiques ou électriques comprenant un câble conducteur de l'électricité.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le signal transmis est stocké de façon intermédiaire (avant d'être transmis à la seconde matière) sur un support de stockage électro-magnétique de type connu en lui même, comme une bande magnétique, ou après traitement par un convertisseur analogique/numérique sur un support de stockage numérique.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le signal transmis est traité par des méthodes de traitement numérique ou analogique connues en elles-même, pour être modifié et correspondre ainsi à une substance présentant un principe actif modifié, optimisé, amplifié, purifié ou sans effets secondaires.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le signal transmis correspond à celui émis par plusieurs substances présentes dans la première matière et en ce que l'on traite ledit signal par des méthodes de traitement numérique ou analogique connues en elles-même, pour analyser et mesurer une desdites substances parmi les autres.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la substance déterminée est présente en dose homéopathique dans la première matière porteuse.

16. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la substance déterminée est présente en dose homéopathique dans la première matière porteuse, avec des dilutions supérieures à la limite indiquée par le nombre d'Avogadro.

17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que la dilution est une dilution de l'ordre de  $-\log_{10} M$  (théorique).





18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la seconde matière est constituée par des granules homéopathique.

19. Matière en un volume fini et porteuse d'une information caractéristique du comportement biologique spécifique à une substance déterminée, mais en l'absence totale de cette substance déterminée dans ladite matière, cette information étant à caractère électrique ou électromagnétique en raison de sa capacité à être transmissible par des moyens électriques ou électromagnétiques, cette manifestation étant normalement révélabale par l'action exercée par cette matière en volume fini à l'égard d'un substrat spécifique à la substance déterminée dans un protocole expérimental identique ou semblable à celui que l'on mettrait en oeuvre pour rendre compte de la présence de ladite substance déterminée dans un milieu qui la contiendrait.

20. Matière porteuse d'une information caractéristique du comportement biologique spécifique à une substance déterminée, caractérisée par le fait qu'elle est susceptible d'être produite par un procédé comportant la mise en relation électrique ou électromagnétique de la même matière, cependant non initialement porteuse de la susdite information et exempte de toute présence physique de ladite substance déterminée, avec un milieu contenant cette dernière, par l'intermédiaire de moyens de transmission de signaux électromagnétiques ou électriques comprenant un appareil muni de moyens récepteurs et de moyens amplificateurs à haut gain et des moyens de filtration des hautes fréquences au-dessus de 10 kHz.

21. Dispositif (1) de transmission sous forme d'un signal de l'activité biologique ou du comportement biologique spécifique à une substance déterminée, à partir d'une première matière (2) porteuse présentant ladite activité, à une deuxième matière porteuse (4)



initialement exempte de toute présence physique de ladite substance déterminée comprenant :

- des moyens (5) capteurs de signaux électriques ou électromagnétiques émis par une première matière et caractéristiques d'une manifestation spécifique d'une activité biologique d'une substance déterminée contenue dans cette matière première,
- des moyens (9) amplificateurs à haut gain desdits signaux, connectés auxdits moyens capteurs ;
- un filtre coupe haut connecté auxdits moyens capteurs agencé pour filtrer toutes fréquences dans le circuit au-dessus de 10 kHz,
- et des moyens (11) émetteurs connectés audit circuit et propres à transmettre des signaux également caractéristiques de l'activité biologique à une deuxième matière autrement dépourvue de tout contact avec la première.

22. Dispositif selon la revendication 21, caractérisé en ce que le circuit électronique comprend un transistor de sortie monté en émetteur commun.

23. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 21, 22 et 23, caractérisé en ce que le capteur (5) et l'émetteur (11) comportent des bobines électromagnétiques (8,15).

24. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, caractérisé en ce que l'alimentation de l'appareil se fait par batterie.

25. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 25, caractérisé en ce que il comprend de plus des moyens support de stockage électro-magnétique du signal transmis et/ou des moyens convertisseur analogique/numérique dudit signal et des moyens de stockage sur support numérique dudit signal.

26. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 21 à 25, caractérisé en ce que il comprend de plus des moyens de traitement numérique ou analogique pour modifier ledit signal pour le faire correspondre à



une substance présentant un principe actif modifié, optimisé, amplifié, purifié ou sans effets secondaires.

27. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 26, caractérisé en ce que il comprend de plus des moyens de traitement numérique ou analogique pour analyser et mesurer le signal provenant d'au moins une substance transmise parmi d'autres, à partir de la première matière.









FIG. 1

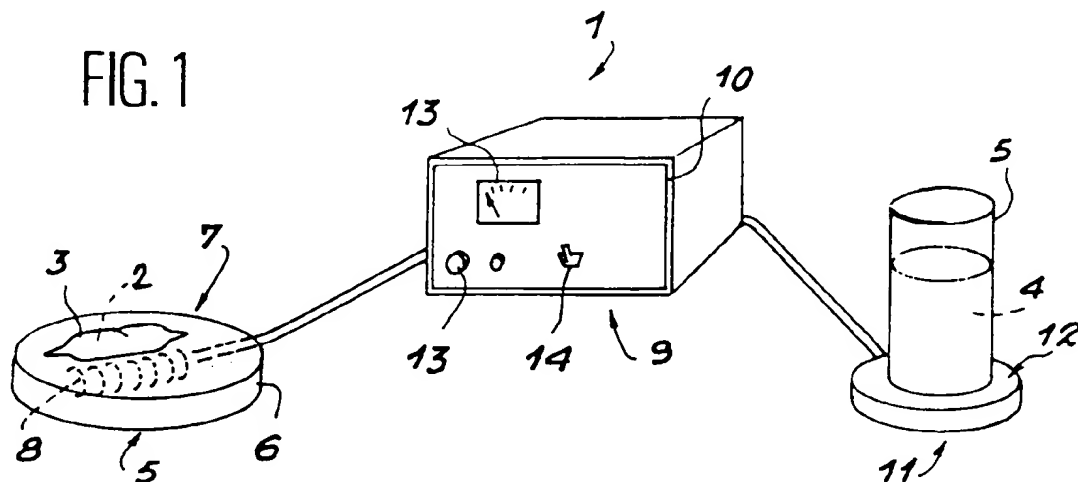
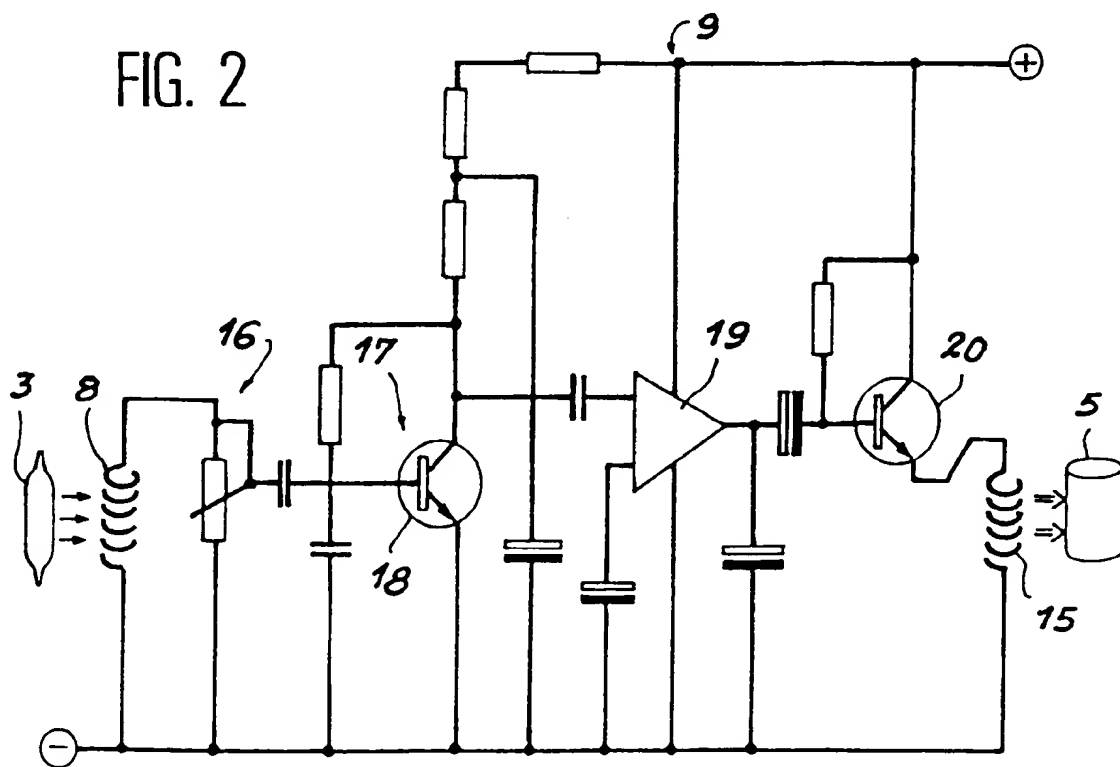


FIG. 2





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 94/00079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 G01N33/487 A61K41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR,A,2 634 381 (MOREZ) 26 January 1990 cited in the application	1,3-7, 10-13, 15-19
Y	see the whole document	8,9,14
A	---	20,21
Y	DE,A,42 02 145 (BRÖKER, ERNST) 30 July 1992 see the whole document	8
Y	FR,A,2 290 224 (ELMATRON GMBH & CO KG.) 4 June 1976 see the whole document	9
Y	US,A,4 692 685 (BLAZE) 8 September 1987 see the whole document	14
	---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 1994

Date of mailing of the international search report

30.06.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel.: (+ 31-70) 340-2040, Ex. 31 651 cpo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Bosma, R



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 94/00079

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 260 949 (DALTON) 7 April 1981 see the whole document -----	22,24



## INTERNATIONAL PATENT REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/FR 94/00079

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2634381	26-01-90	NONE	
DE-A-4202145	30-07-92	DE-U- 9100848	16-05-91
FR-A-2290224	04-06-76	NONE	
US-A-4692685	08-09-87	AU-B- 589116	05-10-89
		AU-A- 4010085	19-09-85
US-A-4260949	07-04-81	NONE	

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200



A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 5 G01N33/487 A61K41/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 5 G01N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR,A,2 634 381 (MOREZ) 26 Janvier 1990 cité dans la demande	1,3-7, 10-13, 15-19
Y	voir le document en entier	8,9,14
A	---	20,21
Y	DE,A,42 02 145 (BRÖKER, ERNST) 30 Juillet 1992 voir le document en entier	8
Y	FR,A,2 290 224 (ELMATRON GMBH & CO KG.) 4 Juin 1976 voir le document en entier	9
Y	US,A,4 692 685 (BLAZE) 8 Septembre 1987 voir le document en entier	14
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "I" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  22 Juin 1994		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  30.06.94
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Bosma, R



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 94/00079

C (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents

no. des revendications visées

A US,A,4 260 949 (DALTON) 7 Avril 1981  
voir le document en entier  
-----

22,24



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale N°

PCT/FR 94/00079

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets)	Date de publication
FR-A-2634381	26-01-90	AUCUN	
DE-A-4202145	30-07-92	DE-U- 9100848	16-05-91
FR-A-2290224	04-06-76	AUCUN	
US-A-4692685	08-09-87	AU-B- 589116	05-10-89
		AU-A- 4010085	19-09-85
US-A-4260949	07-04-81	AUCUN	



5800  
09678555  
**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 5911.WO	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA 416)	
International application No PCT FR99 00915	International filing date (day month year) 19 April 1999 (19.04.99)	Priority date (day month year) 20 April 1998 (20.04.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/53		
Applicant DIGIBIO S.A.		

1 This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36

2 This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and or drawings which have been amended and are the basis for this report and or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 60<sup>7</sup> of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3 This report contains indications relating to the following items:

- I ☐ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☐ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 November 1999 (19.11.99)	Date of completion of this report 25 August 2000 (25.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA EP	Authorized officer
Facsimile No	Telephone No





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT FR99 00915

## I. Basis of the report

1 This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments)*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description. pages 1-28 . as originally filed.  
 pages \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
 pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_  
 pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_ . as originally filed.  
 Nos. \_\_\_\_\_ . as amended under Article 19.  
 Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
 Nos. 1-72 . filed with the letter of 10 May 2000 (10.05.2000)  
 Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings. sheets fig 1-7-7 . as originally filed.  
 sheets fig \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
 sheets fig \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_  
 sheets fig \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_

2 The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings. sheets fig \_\_\_\_\_

3 ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT FR99 00915

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1-22

because

☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*)

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*)

☒ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed

☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/00915

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of III

No opinion has been established concerning the international application as it does not meet the requirements of PCT Articles 1 and 6.

The IEPA is thus not able to determine the meaning of an "electromagnetic signal characteristic of biological activity in an entity" as the signal is not identified in a sufficiently clear and complete manner in the description.

Indeed, the said electromagnetic signal characteristic of biological activity in an entity is an essential feature of the invention. Nonetheless "the identity" of this signal is not disclosed in the description, which does not introduce any value or unit of measurement characterizing the said signal.

The subject matter of claims 1-11 is therefore not supported by the description. PCT Article 6, which does not disclose the invention in a manner sufficiently clear and complete for the invention to be carried out by a person skilled in the art (PCT Article 5).

As the claims are not adequately supported by the description, it is not possible to formulate a valid opinion.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 98/00916

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The additional details submitted in brackets in claims 32, 33, 34 and 35 do not make it possible to clearly define the subject matter of said claims, which therefore do not meet the requirements of PCT Article 6.

